



N° d'ordre :

THESE DE DOCTORAT

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

En vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Spécialité :

GENIE ENZYMATIQUE BIOCONVERSION MICROBIOLOGIE

par

Abdeslem RAHAOUI

**ECOPHYSIOLOGIE DE *RHODELLA VIOLACEA* (RHODOPHYTA)
PRODUCTION ET PROPRIETES STRUCTURALES DES
EXOPOLYSACCHARIDES ET DE L'AMIDON FLORIDEEN**

soutenue le 6 février 1999

devant la commission d'examen :

Président : Pr Yves LEMOINE

Rapporteurs : Pr Henri MORVAN
Pr Ioannis KARAMANOS

Examineurs : Pr Steven BALL
Dr Christophe BLIARD

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Cytophysiologie Végétale et Phycologie dirigé par le Monsieur le Professeur Yves LEMOINE à qui j'adresse mes vifs remerciements. J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Steven BALL qui m'a accueilli dans son laboratoire et offert les moyens matériels et techniques pour l'étude de l'amidon floridéen. Je tiens à remercier Monsieur le Docteur C. BLIARD pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire et pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je tiens à remercier Monsieur le Professeur H. MORVAN et Monsieur le Professeur Y. KARAMANOS pour avoir accepté de juger ce travail et pour les nombreux conseils qu'ils m'ont prodigués. Je tiens à remercier Madame le Professeur S. TURRELL et les membres de son équipe pour avoir mis à ma disposition le matériel pour les analyses en spectroscopie IR-TF. Je remercie Monsieur le Docteur L. BODINEAU, Maître de Conférences dans le Laboratoire de Chimie Analytique et Marine, pour sa contribution à l'étude des interactions ions métalliques et polysaccharides. Je remercie Monsieur le Docteur Y. LEROY de m'avoir initié à la « Dionex » et Monsieur le Docteur A. BULEON pour les analyses de l'amidon par diffractions aux rayons X. Je tiens à remercier Monsieur le Docteur R. KLING, Maître de Conférences pour tous ses précieux conseils mais aussi pour ses grandes qualités humaines. Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé tout au long de ce travail, je pense en particulier aux membres de l'équipe de Génétique Microbienne de l'UMR-CNRS n° 111, Christophe C., Virginie, Christophe D. et Marion pour leur coup de main, André pour son accueil et sa sympathie, David pour la sono et sans oublier Grégory et Zab. Mes remerciements vont également à Monsieur le Docteur B. SCHOEFS avec qui il m'était agréable de travailler et pour son accueil chaleureux pendant mon séjour à Liège en Belgique.

Je tiens à remercier tous les membres du Laboratoire de Cytophysiologie Végétale et Phycologie pour leur aide, leur agréable compagnie, leur sympathie, tous sans

exception et sans oublier les anciens, Jean Claude et Pascal dont l'apparition au labo nous fait toujours plaisir.

Je remercie tous les membres du bâtiment SN2 qui m'ont donné un peu de leur temps ainsi que les membres du corps administratif au bâtiment A3 avec lesquels il m'a été agréable de travailler. Je remercie aussi les membres du corps administratif du S.U.D.E.S. et tous mes anciens stagiaires.

Je remercie vivement mes beaux parents, Henri et Christiane, qui ont contribué indirectement à l'achèvement de ce travail en prenant soin de mes trois petits « Anges » à chaque fois que cela était nécessaire. Je me pose la question si je dois remercier ma femme pour tous les sacrifices et les efforts qu'elle a fournis durant toutes ces années, ou je dois tout simplement lui dire « c'était pour le meilleur et pour le pire ».

*Je dédie ce travail à Catherine, ma femme, mes trois enfants,
Dounia, Sofiane et Inès, à mes parents, à mes beaux parents,
à mon frère et à mes sœurs.*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE : Les algues, réservoirs de substances naturelles d'intérêt

I - INTRODUCTION	1
II - LES MACROALGUES	2
A - Les phycocolloïdes	3
1 - Les alginates	3
2 - Les carraghénanes	4
3 - Les agars	6
B - Les protéines	7
C - Les molécules bioactives	8
III - LES MICROALGUES	8
A - Les produits à potentialités économiques issus des microalgues	9
1 - Vitamines, caroténoïdes, acides gras et hydrocarbures	10
2 - Les osmorégulateurs	11
3 - Les pigments	11
4 - Les composés biologiquement actifs de types antibiotiques, antifongiques et toxines	11
a - Antimicrobiens	12
b - Activité antivirale	12
c - Toxines et activité pharmacologique de substances algales	12
B - L'utilisation directe de la biomasse	13
IV - LES ALGUES ROUGES (RHODOPHYTA)	14
A - La classification des Rhodophytes	14
B - La microalgue <i>Rhodella violacea</i>	14
1 - Origine	14
2 - La pigmentation chez <i>Rhodella violacea</i>	15

CHAPITRE I - Influence des paramètres physiologiques (l'azote, la température et la lumière) sur le comportement de *R. violacea* en croissance, en culture non renouvelée

I - INTRODUCTION	17
II - MATERIEL ET METHODES	20
A - Matériel biologique	20
B - Milieu de culture	20
C - Analyse des pigments liposolubles chez <i>Rhodella violacea</i>	20
1 - Extraction et séparation des pigments	20
2 - Analyse qualitative des pigments séparés par HPLC	20

D - Influence de la concentration initiale en azote sur la croissance de <i>R. violacea</i>	21
1 - Milieu de culture	21
2 - Dénombrement des cellules	21
E - Mesure de la fluorescence de la chlorophylle	21
1 - Principe	21
2 - Niveaux de fluorescence F ₀ , F _m et F _v	22
3 - Mesures de fluorescence à l'aide du PAM.	22
F - Le stress et la restauration.....	24
G - Expérience de thermofluorescence	24
H - Analyse des acides gras	25
1 - Extraction des lipides.....	25
2 - Méthylation des acides gras	25
3 - Séparation des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse	26
III - RESULTATS ET DISCUSSION	27
A - Analyse qualitative de pigments liposolubles chez <i>R. violacea</i>	27
B - Influence de la concentration initiale d'azote dans le milieu de culture sur la croissance de <i>R. violacea</i>	27
C - Influence de la température sur la croissance de <i>R. violacea</i>	29
D - Effet de la température sur la physiologie de <i>R. violacea</i>	32
E - Thermosensibilité de l'appareil photosynthétique chez <i>R. violacea</i>	36
1 - Evolution de la fluorescence F ₀ en fonction d'un gradient de température	36
2 - Rôle des phycobiliprotéines dans l'évolution de la fluorescence F ₀ induite par la température.....	38
3 - Influence de la température de culture sur la thermosensibilité de l'appareil photosynthétique.....	39
F - Effet de la température de culture sur la composition en acides gras chez <i>R. violacea</i>	42
IV - CONCLUSION	47

CHAPITRE II - Les exopolysaccharides chez *R. violacea*

I - INTRODUCTION	48
II - MATERIEL ET METHODES	52
A - Extraction des polysaccharides solubles	52
B - Extraction des polysaccharides capsulaires.....	52
C - Analyse chimique des deux types de polysaccharides	53
1 - Dosages colorimétriques.....	53
2 - Dosage des sulfates par HPLC	53

3 - Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	53
D - Etude de l'affinité des métaux lourds aux polysaccharides.....	54
1 - Préparation des complexes ions polysaccharides	54
a - Transformation des fonctions carboxyliques sous forme	54
b - Détermination du pKa des polysaccharides	54
c - Mise en contact des polysaccharides et des différents métaux.....	54
2 - Dosage des métaux dans les solutions de polysaccharides.....	55
3 - Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des complexes ions métalliques-polysaccharides.....	55
III - RESULTATS ET DISCUSSION	56
A - Production des exopolysaccharides (EPS) par <i>R. violacea</i>	56
B - Polysaccharides capsulaires et extracellulaires (solubles)	58
1 - Composition monosaccharidique et taux de sulfate et d'acide uronique	58
2 - Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)	59
C - Affinité des exopolysaccharides (EPS) aux métaux lourds.....	60
IV - CONCLUSION	64

CHAPITRE III - Les polysaccharides de réserve

I - L'AMIDON CHEZ LES VEGETAUX SUPERIEURS	65
A - Le grain	65
B - Les constituants majeurs de l'amidon.....	67
1 - L'amylopectine	67
2 - L'amylose.....	68
C - Les autres constituants de l'amidon.....	71
1 - La fraction glucidique dite amylopectine II ou " matériel anormal ".....	71
2 - La fraction non glucidique	71
a- La fraction lipidique	71
b - La fraction protéique	72
3 - Les phosphates	72
D - Métabolisme de l'amidon	72
1 - La voie de biosynthèse de l'amidon.....	73
a - Synthèse du nucléotide sucre.....	74
b - Etape d'élongation.....	74
c - Etapes de branchement.....	75
2 - Dégradation de l'amidon	75
3 - Métabolisme général de l'amidon.....	76
E - Intérêt économique de l'amidon	77

1 - Quelques domaines d'application de l'amidon	77
a - Transformation industrielle de l'amidon en Glucose / fructose	77
b - Production d'édulcorants.....	78
c – Autres molécules	80
II - L'AMIDON CHEZ LES RHODOPHYTA.....	80
III - MATERIEL ET METHODES	85
A - Matériel biologique	85
B- Extraction de l'amidon floridéen	85
1 - A partir de <i>Rhodella violacea</i>	85
2 - A partir de <i>Porphyridium cruentum</i>	85
3 - A partir de <i>Gracilaria gracilis</i>	86
C - Dosage de l'amidon.....	86
D - Détermination des spectres des complexes polysaccharides-iode	86
E - Fractionnement de l'amidon sur colonne de filtration sur gel Sépharose CL2B	87
F - Détermination de la distribution en longueur de chaînes de l'amylopectine et de l'amylose.....	87
1 - Débranchement par l'isoamylase	87
2 - Analyse des produits libérés par la réaction de débranchement.....	88
a - Chromatographie de filtration sur gel TSK HW50.....	88
b - Chromatographie d'échange d'anions à détection ampérométrique pulsée (HPAE-PAD).....	89
c - Electrophorèse après dérivatisation des glucanes	90
G - Détermination des liaisons osidiques par méthylation	90
H - Analyses par RMN du proton.....	90
I - Analyse en infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	91
J - Etudes enzymatiques.....	91
1 - Extraction des protéines liées au grain	91
2 - Dosage de l'activité synthétase liée	92
IV – RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	93
A - Production de l'amidon floridéen par <i>Rhodella violacea</i>	93
B - Fractionnement de l'amidon par chromatographie en filtration sur gel CL2B	93
C - Etude des branchements de l'amylopectine.....	95
1 - Etude par RMN du proton	95
2 - Distribution en longueurs de chaînes	96
a - Chromatographie de tamisage moléculaire TSK HW50	96
b - Chromatographie HPAE-PAD.....	98
c- Electrophorèse après dérivatisation de glucanes	98
D - Etude de la structure de l'amidon floridéen par diffraction aux rayons X.....	100

E - Détermination des types de liaisons osidiques par méthylation	100
F - Analyse par spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)	103
1 - Spectres IR-TF d'amylopectine.....	104
2 - Spectres IR-TF d'amylose	105
G - Etudes enzymatiques.....	106
1 - Mise en évidence de la protéine liée au grain par séparation sur gel d'électrophorèse.....	106
2 - Recherche d'une activité GBSS.....	106
H - L'amidon floridéen chez d'autres Rhodophyta	108
1 - Chez <i>Porphyridium cruentum</i> Näegeli	108
2 - Chez <i>Gracilaria gracilis</i>	109
V - DISCUSSION.....	110
VI - CONCLUSION	112
CONCLUSION GENERALE.....	113
BIBLIOGRAPHIE	115
ANNEXE	
LISTE DES TRAVEAUX	

LISTE DES ABREVIATIONS

<i>λ max.</i>	<i>Longueur d'onde du maximum d'absorption</i>
<i>ADP-glc</i>	<i>Adénosine diphospho-glucose</i>
<i>Am</i>	<i>Amylose</i>
<i>AMN-</i>	<i>Amylose obtenu dans la condition de carence en azote</i>
<i>AMN+</i>	<i>Amylose obtenu dans la condition avec azote dans le milieu de culture</i>
<i>Apl</i>	<i>Amylopectine de type I</i>
<i>ApII</i>	<i>Amylopectine de type II</i>
<i>APN-</i>	<i>Amylopectine obtenu dans la condition de carence en azote</i>
<i>APN+</i>	<i>Amylopectine obtenu dans la condition avec azote dans le milieu de culture</i>
<i>APTS</i>	<i>Acide 8-amino-1,3,6-pyrénétrisulfonique</i>
<i>AS</i>	<i>Amidon synthétase</i>
<i>ASS</i>	<i>Amidon synthétase soluble</i>
<i>ASSI</i>	<i>Amidon synthétase soluble de type I</i>
<i>ASSII</i>	<i>Amidon synthétase soluble de type II</i>
<i>ATP</i>	<i>Adénosine triphosphate</i>
<i>CGT</i>	<i>Cyclodextrines glycosyltransférases</i>
<i>Chl</i>	<i>Chlorophylle</i>
<i>CPG</i>	<i>Chromatographie en phase gazeuse</i>
<i>CTAB</i>	<i>N-cétyl-N,N,N,triméthyl-ammonium bromure</i>
<i>d.p.</i>	<i>Degré de polymérisation</i>
<i>Da</i>	<i>Dalton</i>
<i>DEAE</i>	<i>Diéthyl amino éthyl</i>
<i>DGDG</i>	<i>Digalactosyl diacylglycéride</i>
<i>DMSO</i>	<i>Diméthyl sulfoxyde</i>
<i>DTT</i>	<i>Dithithreitol</i>
<i>EB</i>	<i>Enzyme de branchement</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ethylène diamine tétra acétates</i>
<i>EMA</i>	<i>Eau de mer artificielle</i>
<i>EPA</i>	<i>Acide eicosapentanoïque</i>
<i>EPS</i>	<i>Exopolysaccharide</i>
<i>F0</i>	<i>Fluorescence induite par la lumière modulée</i>
<i>Fm</i>	<i>Fluorescence maximale</i>
<i>Fv</i>	<i>Fluorescence variable</i>
<i>Gal</i>	<i>Galactose</i>
<i>GBSS</i>	<i>Amidon synthétase liée (Granule Bound Starch Synthase)</i>
<i>GDP-Glc</i>	<i>Guanosine-diphospho-glucose</i>

Glc	Glucose
Glc-6-P	Glucose –6-phosphate
HAPE-PAD	Chromatographie échangeuse d'anions à haut pH avec détection ampérométrique pulsée
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IR-TF	infrarouge à transformée de Fourier
KDa	Kilo dalton
Km	Constante de Michaelis (d'affinité)
LHCII	Light harvesting complex
Man	Mannose
MGDG	Monogalactosyl diglycéride
NADP	Nicotinamine adénosine diphosphate
NADPH,H+	Nicotinamine adénosine diphosphate (réduit)
nm.	Nanomètre
PAM-2000	Pulse Amplitude Modulation fluorometer, Waltz GmBh)
PBP	Phycobiliprotéines
PC	Phosphatidylcholine
pe	phase exponentielle
PE	Phosphatidyl éthanolamine
PE/Chl	Phycoérythrine/chlorophylle
Pka	Constante d'acidité
pl	phase de latence,
ppm	Partie par million
ps	phase stationnaire
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Rha	Rhamnose
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEA-CPI	Spectroscopie d'émission atomique à couplage de plasma inductif
SQDG	6-sulfoquinovosyl diglycéride
SSS	Amidon synthétase soluble (Soluble Starch Synthase)
UDP-glc	Uridine diphospho-glucose
UHQ	Eau Ultra Haute Qualité
Vm	Vitesse maximale
Xyl	Xylose

LISTE DES FIGURES

	<i>Pages</i>
<i>Figure 1 : Structure secondaire de l'acide alginique. A) acide polymannuronique ; B) acide polyglucuronique</i>	4
<i>Figure 2 : Représentation schématique du modèle « boîte à œufs » de Rees (1969) montrant le mécanisme de précipitation de l'alginate en présence du calcium</i>	4
<i>Figure 3 : Structures des unités disaccharidiques répétitives dans les différents types de carraghénanes : ι, κ, λ, ξ, π.</i>	5
<i>Figure 4 : Représentation schématique du polymère d'agarose et dénomination de ses dimères respectifs d'après Araki (1958)</i>	6
<i>Figure 5 : Mécanisme de gélification de l'agarose d'après Arnott et collaborateurs (1974)</i>	7
<i>Figure 6 : Deux acides aminés d'origine algale : l'acide kaïnique et l'acide domoïque</i>	8
<i>Figure 7 : Différents domaines d'application des microalgues d'après Callegari (1989)</i>	9
<i>Figure 8 : Représentation hypothétique de la structure globulaire d'un phycobilisome de <i>Porphyridium cruentum</i> (d'après Gantt et coll., 1990)</i>	16
<i>Figure 9 : Chaîne de transfert des électrons dans le mécanisme photosynthétique chez les organismes à phycobilisomes</i>	18
<i>Figure 10 : Représentation schématique des composants principaux et de la séquence du transfert d'électrons du complexe PSII</i>	19
<i>Figure 11 : Mode d'enregistrement et de calcul de la fluorescence à l'aide du P.A.M, (A) : départ lumière modulée, (B) : éclair-Flash saturant, (C) : lumière actinique non saturante</i>	23
<i>Figure 12 : Le maturateur</i>	24
<i>Figure 13 : <i>R. violacea</i> cultivée dans le milieu Provasoli comportant des concentrations initiales en azote de (NaNO_3) ; (1) : 35 mg/l ; (2) : 70 mg/l ; (3) : 210 mg/l, après 20 jours de culture ($150 \mu\text{mole photon cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, photopériode 16/8 J/N, 20°C)</i>	27
<i>Figure 14 : Evolution du nombre de cellules de <i>R. violacea</i> cultivées dans le milieu Provasoli supplémenté de 35 mg/l, 70 mg/l ou de 210 mg/l NaNO_3</i>	28
<i>Figure 15 : Courbes de croissance de <i>R. violacea</i> à 10, 20 et 30°C (représentation dans l'échelle non logarithmique)</i>	30
<i>Figure 16 : Courbes de croissance de <i>R. violacea</i> cultivée à des températures de 10, 20, et 30°C (représentation en coordonnées semi-logarithmiques)</i>	31
<i>Figure 17 : Réactions constituant le cycle des xanthophylles. Les deux étapes de dé-époxydation sont assurées par une seule enzyme ; de même une seule enzyme assure les deux réactions d'époxydation</i>	33
<i>Figure 18 : Photoinhibition et restauration des cellules de <i>R. violacea</i> soumises à un stress lumineux (F_v/F_m exprimé en % de la valeur initiale de ce rapport qui est obtenue au 6^{ème} jour de culture des cellules dans les trois conditions de températures 10, 20 et 30°C)</i>	34

Figure 19 : Courbe de fluorescence-température obtenue sur des cellules de <i>R. violacea</i> cultivées à 20°C,	37
Figure 20 : Courbes fluorescence-température chez les cellules de <i>R. violacea</i> cultivées dans un milieu avec azote (A) et sans azote (B).	38
Figure 21 : Illustration des températures critiques (T1, T2, T3, T4, T5) sur un enregistrement fluorescence-température, selon Havaux et Gruszecki (1993)	39
Figure 22 : Evolution des températures critiques T1; T2, T3, T4, T5, pour les trois conditions de températures de cultures 10, 20 et 30°C	41
Figure 23 : Teneurs en acides gras membranaires insaturés dans les trois phases de croissance (pl = phase de latence, pe = phase exponentielle, ps = phase stationnaire) pour les trois températures de culture 10, 20 et 30°C.	43
Figure 24 : Composition en acides gras saturés et insaturés des cellules de <i>R. violacea</i> cultivées à 10, 20 et 30°C, valeurs estimées au cours des phases de croissance : (pl = phase de latence, pe = phase exponentielle, ps = phase stationnaire)	45
Figure 25 : Evolution de la teneur en acides gras : le C20:4 ω 6 acide arachidonique et le C20 : 5 ω 3 acide eicosapentaenoïque (EPA)	46
Figure 26 : Représentation schématique du déplacement de cellules de <i>P. cruentum</i> par sécrétion de mucilage polysaccharidique (Lin et coll., 1975)	49
Figure 27 : Structures d'un acide aldobiuronique : 3-O-(α -D-glucopyranosyluronique)-L-galactose	51
Figure 28 : Boudins remplis de solution de polysaccharides après dialyse de 48 heures contre des solutions 0,2 M (les ions sont passés des solutions ioniques vers les solutions polysaccharidiques)	55
Figure 29 : Cellules de <i>Rhodella violacea</i> vues au microscope optique en présence d'encre de chine (X 500)	56
Figure 30 : Evolution au cours de la croissance de <i>R. violacea</i> de la quantité de polysaccharides dissous, lors de cultures réalisées dans des milieux à trois concentrations différentes en azote (35, 70 et 210 mg/l)	57
Figure 31 : Evolution au cours de la croissance de <i>R. violacea</i> de la production cellulaire en polysaccharides, lors de cultures réalisées dans des milieux de concentrations croissantes en azote (35, 70 et 210 mg/ml)	57
Figure 32 : Spectres infrarouges des polysaccharides capsulaires et extracellulaires de <i>R. violacea</i>	59
Figure 33 : Courbe de titrage de la solution de polysaccharides préalablement protonés par la résine Amberlite	62
Figure 34 : Quantités d'ions en mole par gramme de polysaccharides, dosées par SEA-CPI dans les solutions de polysaccharides après la seconde dialyse contre l'eau.	63

<i>Figure 35 : Variations des rapports (1400/1040 et 1250/1040) des intensités des bandes estimées dans les spectres IR-TF sur les complexes ions-polysaccharides. Le rapport 1400/1040 permet l'estimation de la fixation des métaux sur la fonction carboxylique, le rapport 1250/1040 permet l'estimation de la fixation des métaux sur la fonction sulfate des polysaccharides.</i>	63
<i>Figure 36 : Représentation schématique de l'architecture du grain d'amidon proposée par Lineback (1984)</i>	66
<i>Figure 37 : Schéma général de l'organisation du grain d'amidon : A) grain formé d'une succession alternée d'anneaux concentriques avec zone amorphe et semi-cristalline ; B) extension de la zone encadrée dans A ; C) structure en grappe de l'amylopectine ; D) représentation des associations en double hélice des chaînes d'une grappe (Ball et coll., 1996)</i>	66
<i>Figure 38 : Structure branchée de l'amylopectine</i>	67
<i>Figure 39 : Schéma simplifié représentant différents types de chaînes au sein de l'amylopectine (d'après Manners, 1989)</i>	67
<i>Figure 40 : Structure linéaire de la molécule d'amylose</i>	68
<i>Figure 41 : Domaine d'absorption des complexes iode-polysaccharides (Thorn et Mohazzeb, 1990)</i>	70
<i>Figure 42 : Modèle de la répartition dans le grain des divers constituants de l'amidon (Blanshard, 1987)</i>	70
<i>Figure 43 : Profil d'éluion d'amidon sur Chromatographie gel filtration TSK HW75 : ApI : amylopectine I ; ApII : Amylopectine II (fraction glucidique dite anormale), Am : Amylose (Libessart, 1996)</i>	71
<i>Figure 44 : Glucose 6 phosphate et glucose 3 phosphate</i>	72
<i>Figure 45 : Différentes étapes de la biosynthèse d'amidon :</i>	73
<i>① ADP Glc pyrophosphorylase, ② (AS) amidon synthétase, ③ (EB) enzymes de branchement</i>	
<i>Figure 46 : Schéma général du métabolisme de l'amidon chez les végétaux supérieurs</i>	76
<i>Figure 47 : Procédés industriels de la transformation de l'amidon en sirops de glucose et de fructose</i>	79
<i>Figure 48 : Profil de la séparation sur chromatographie en gel de filtration CL2B de l'amidon floridéen produit en condition de carence en azote par Rhodella violacea (un spectre du complexe iode-polysaccharides est réalisé en 400 et 700 nm pour chaque fraction de 3ml, la densité optique est enregistrée au pic du maximum d'absorption -ou λ max.-). La fraction exclue correspond à l'amylopectine, la fraction retenue à l'amylose</i>	94
<i>Figure 49 : Spectres RMN ¹H : A) amylopectine ; B) amylose, issus de l'amidon floridéen de R. violacea</i>	95
<i>Figure 50 : Cinétique d'hydrolyse par l'isoamylase de Pseudomonas de l'amylopectine purifiée par fractionnement d'amidon floridéen de R. violacea sur CL2B</i>	96

Figure 51 : Profil d'élution sur chromatographie TSK HW50 de l'hydrolysate de l'amylopectine. Sur chaque fraction de 3 ml est effectué le dosage des sucres totaux et un spectre entre 400 et 700 nm des complexes iode-polysaccharides ; à partir des λ max. obtenues sont déterminés les d.p. moyens des oligosaccharides dans chaque fraction	97
Figure 52 : Distribution en longueurs de chaînes de l'amylopectine de l'amidon floridéen. Les pourcentages sont obtenus par calcul des rapports des quantités des sucres totaux dans chaque fraction ; les d.p. moyens sont calculés selon la formule de Fales en utilisant les λ max. obtenues pour chaque fraction après séparation sur gel de filtration TSK HW50 de produit de la réaction isoamylosique	97
Figure 53 : Distribution de longueurs de chaînes, profil obtenu par séparation en HPAE-PAD d'un hydrolysate isoamylasique de l'amylopectine purifiée à partir de l'amidon floridéen de <i>R. violacea</i>	98
Figure 54 : Analyse par électrophorèse de la distribution en longueurs de chaînes, A : Amylopectine témoin, B : amylopectine de <i>R. violacea</i> cultivée en +N, C : Amylopectine de <i>R. violacea</i> cultivée en -N	99
Figure 55 : Représentation des divers types de liaisons révélées par l'analyse des polysaccharides par méthylation et séparation par chromatographie en phase gaz	101
Figure 56 : Spectres infrarouges de l'amylopectine issue de <i>R. violacea</i> cultivée dans des conditions avec azote APN+ et sans azote APN-, et de l'amylopectine de <i>Chlamydomonas</i> souche BAFR1	103
Figure 57 : Profils des spectres obtenus en IR-TF sur l'amylose issu des cultures enrichies (AMN+) et pauvres (AMN-) en azote	105
Figure 58 : Séparation et mise en évidence sur gel d'électrophorèse SDS de la protéine liée au grain d'amidon floridéen de <i>R. violacea</i> cultivée dans la condition non carencée en azote	106
Figure 59 : Représentation en double inverse, selon Lineweaver-Burk, des cinétiques des réactions de la GBSS vis à vis des deux nucléotides sucre (ADP-Glc et UDP-Glc) dans le grain d'amidon	107
Figure 60 : Profil de fractionnement sur gel filtration (CL2B) de l'amidon floridéen extrait à partir de <i>Porphyridium cruentum</i> (un spectre du complexe iode-polysaccharides est réalisé entre 400 et 700 nm pour chaque fraction de 3ml, la densité optique est enregistrée au pic du maximum d'absorption -ou λ max.-). La fraction exclue correspond à l'amylopectine. Au voisinage de la fraction 120, on observe une légère apparition du complexe iode-polysaccharides qui témoigne de la présence d'amylose même en très faible quantité.	108
Figure 61 : Spectre RMN du ^1H de l'amylopectine de <i>Porphyridium cruentum</i>	109
Figure 62 : Profil d'élution de l'amidon issu de <i>Gracilaria gracilis</i> (un spectre du complexe iode-polysaccharides est réalisé entre 400 et 700 nm pour chaque fraction de 3 ml, la densité optique est enregistrée au pic du maximum d'absorption -ou λ max.-). La fraction exclue correspondant à l'amylopectine est unique dans ce cas	109
Figure 63 : Spectre RMN du ^1H du proton de l'amylopectine de <i>Gracilaria gracilis</i>	110

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
<i>Tableau 1 : Les groupes majeurs d'espèces d'algues ; Chl = type de chlorophylle ; PBP = phycobiliprotéines (d'après Lee, 1989)</i>	2
<i>Tableau 2 : Activité antibiotique des extraits d'algues marines sur certaines bactéries d'après Borowitzka (1995)</i>	12
<i>Tableau 3 : Classification de la division des Rhodophyta</i>	14
<i>Tableau 4 : Influence de la concentration initiale en azote sur le temps de doublement et sur la concentration finale cellulaire</i>	29
<i>Tableau 5 : Temps de doublement en phase exponentielle de croissance et concentration cellulaire finale pour les trois conditions de températures utilisées (10, 20 et 30°C)</i>	31
<i>Tableau 6 : Ampleurs de la photoinhibition et de la restauration chez R. violacea cultivée à 10, 20 et 30°C, exprimées en % de la valeur initiale du rapport Fv/Fm</i>	35
<i>Tableau 7 : Proportions relatives des acides gras au cours des trois phases de croissance (PL= phase de latence, PE= phase exponentielle, PS= phase stationnaire) et dans les trois conditions de température de culture (10°C, 20°C et 30°C)</i>	44
<i>Tableau 8 : Pourcentages en acide uronique et en sulfate, et composition centésimale en monosaccharides dans les polysaccharides extracellulaires selon le mode de précipitation (au CTAB ou à l'éthanol) et dans les polysaccharides capsulaires (extraits, résiduels) (Glc : Glucose ; Gal : Galactose ; Man : Mannose ; Xyl : Xylose ; 3,O-Metxyl : 3,O-méthylxylose ; Rha : Rhamnose).</i>	58
<i>Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques de deux principaux constituants de l'amidon (l'amylose et l'amylopectine)</i>	69
<i>Tableau 10 : Corrélation entre le d.p. et le λ max. du complexe iode-glucanes linéaires (Banks et coll., 1971)</i>	69
<i>Tableau 11 : Enzymes intervenant dans le catabolisme d'amidon des végétaux supérieurs (Steup, 1990)</i>	76
<i>Tableau 12 : Données sur les maximum d'absorption λ max. du complexe iode-amidon floridéen et les longueurs moyennes des chaînes branchées. * : valeurs que nous avons calculées à partir des valeurs données par les auteurs, en utilisant la formule de Fales (1980)</i>	84
<i>Tableau 13 : Quantité d'amidon produite par Rhodella et Chlamydomonas dans les milieux avec azote (+N) et sans azote (-N) ; * : données Libessart (1996)</i>	93
<i>Tableau 14 : Propriétés comparées de l'amylose et de l'amylopectine issus de R. violacea et C. reinhardtii cultivés dans des milieux avec azote (+N) ou sans azote (-N). * : données selon Libessart et coll. (1995) ; ** : d.p. moyen des chaînes B, calculé selon la formule de Fales (1980) (d.p.=3290/(635-λ max.))</i>	94
<i>Tableau 15 : Pourcentage des glucoses méthylés séparés par CPG ; (1) issus du fractionnement de l'amidon floridéen de R. violacea cultivée dans un milieu pauvre en azote, (2) amylopectine commerciale issue du maïs Waxy</i>	102

Avant-Propos

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Cytophysiologie Végétale et Phycologie (LCVP). Les techniques d'analyse des polysaccharides que j'ai utilisées lors de ce travail étaient préalablement mises en œuvre au sein de l'Equipe Polysaccharides Pariétaux des Végétaux (EPPV) à laquelle il a succédé. Notre laboratoire, dirigé par le Professeur Y. LEMOINE, a comme thématique principale l'étude de la photosynthèse chez les végétaux. Une partie de mon travail a donc consisté en l'étude de la stabilité des antennes pigmentaires dans les conditions environnementales choisies pour induire les biosynthèses des polysaccharides. Notre laboratoire n'étant pas équipé en gros appareils d'analyse chimique des sucres, j'ai été amené à établir quelques collaborations avec Madame le Professeur S. TURRELL au LASIR qui a mis à ma disposition le matériel nécessaire pour les analyses en spectroscopie IR-TF, avec Monsieur le Professeur J.P. HUVENNE avec lequel j'ai effectué des analyses en microspectroscopie IR-TF (travaux qui ont été publiés mais qui ne figurent pas dans ce mémoire et d'autres en phase de rédaction). L'étude des interactions entre les exopolysaccharides (EPS) et les ions métalliques et celle du rôle que joueraient ces EPS dans la transformation du Cr (VI) en Cr (III) ont été réalisées en collaboration avec le Docteur L. BODINEAU, dans le laboratoire de Chimie Analytique et Marine dirigé par Monsieur le Professeur WARTEL. Ces travaux ont fait l'objet d'une communication par affiche dans un congrès international.

Monsieur le Professeur S. BALL m'a accueilli dans son laboratoire et a mis à ma disposition les techniques, les compétences et le matériel pour étudier la structure de l'amidon floridéen.

Dans un souci d'homogénéité, je présente dans ce mémoire uniquement les travaux que j'ai effectués sur la microalgue *R. violacea* ; je ne ferai donc pas état de mes autres travaux concernant les macroalgues tels que le *Porphyra* et *Gracilaria* dont les références sont seulement rappelées en annexes.

Le choix de la microalgue *R. violacea* réside dans l'intérêt croissant porté aux métabolites produits par les microorganismes. Nous nous sommes intéressés à

l'étude de cette espèce cultivable au laboratoire car elle fait partie des organismes utilisables pour produire des molécules d'intérêt économique telles que les pigments hydrosolubles, en particulier la R-Phycoérythrine, les exopolysaccharides sulfatés et acides, les acides gras polyinsaturés, en particulier l'acide eicosapentaénoïque (EPA), ainsi qu'un polysaccharide de réserve spécifique (l'amidon floridéen). Cette souche présentait néanmoins quelques inconvénients car elle n'existe dans aucune algothèque sous la forme axénique et sa reproduction sexuée n'a jamais été décrite.

La maîtrise de la culture de microalgues dans les conditions de laboratoire et la connaissance des effets de variations des paramètres de culture sur leur physiologie, sont des étapes incontournables lorsque l'on veut étudier la production et la structure de leurs métabolites.

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré à la recherche des paramètres de culture pour une croissance optimale de cette algue au laboratoire à l'étude de son adaptation aux variations de température par modification de la composition en acides gras des membranes, et à l'incidence de la température de culture sur sa réponse à un stress lumineux. La concentration en azote du milieu de culture influe sur la synthèse des polysaccharides, une carence azotée réduit la croissance et permet une production accrue du polysaccharide de réserve et une diminution de celle des exopolysaccharides.

Le second chapitre concerne l'étude de la production des exopolysaccharides qui présentent un intérêt économique potentiel, de leur composition en monosaccharides neutres et acides et de leur taux de sulfatation. Ils se sont révélés hétérogènes et leur affinité pour les ions métalliques est apparue variable selon le métal considéré.

Dans le dernier chapitre, consacré à la production de polysaccharides de réserve, on montre la présence d'amylose dans l'amidon floridéen et la variation de sa teneur chez deux autres espèces d'algues rouges. Les constituants de cet amidon floridéen possèdent une structure proche de celle des autres amidons ; néanmoins quelques différences ont été mises en exergue telles que le taux de branchement et la distribution en longueurs de chaîne dans l'amylopectine.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE :
LES ALGUES, RESERVOIRS DE SUBSTANCES
NATURELLES D'INTERET

I - INTRODUCTION

La transformation de l'énergie solaire en énergie chimique par les êtres vivants photosynthétiques, constitue le maillon essentiel de la chaîne métabolique qui est à la base de la vie terrestre. Les végétaux macroscopiques terrestres participant à cette transformation d'énergie, sont les plus exploités par l'homme ; pour cela, ils sont les plus étudiés. L'étude des microorganismes unicellulaires participant à la conversion de l'énergie solaire en potentiel chimique et en molécules à haute valeur ajoutée, est en progression constante. En effet, ces microorganismes possèdent des avantages multiples tels que leur diversité, leur faible exigence nutritionnelle due à leur phototrophie, la rapidité de leur vitesse de croissance et la possibilité de contrôler leur culture en photoréacteur et de diriger leur biosynthèse vers certains métabolites recherchés.

Les algues sont des organismes le plus souvent eucaryotes, photosynthétiques, possédant au moins de la chlorophylle a, dont l'appareil végétatif est un thalle. Elles forment avec les champignons le groupe des Thallobiontes. Leurs pigments, qui présentent une grande diversité par rapport à ceux des végétaux supérieurs, permettent de distinguer les algues vertes (Chlorophyta), les algues rouges (Rhodophyta) et les algues brunes (Phéophyta). Elles sont responsables d'environ 50% de la photosynthèse effectuée par les végétaux (John, 1994). Lee (1989) les a classées en une douzaine de groupes, selon leurs compositions pigmentaires, leurs produits de réserve, et leurs caractéristiques ultrastructurales. Ces critères sont résumés dans le tableau 1. Une nouvelle espèce est identifiée par semaine (Radmer et Parker, 1994). John a estimé en 1994 que les 36 000 espèces connues représenteraient 17% des espèces existantes qui correspondraient donc à environ 200 000 espèces.

Tableau 1 : Les groupes majeurs d'espèces d'algues ; Chl = type de chlorophylle ; PBP = phycobiliprotéines (d'après Lee, 1989)

<i>Divisions (Groupes)</i>	<i>Caractéristiques</i>		
	<i>Chl</i>	<i>PBP</i>	<i>Produit de réserve</i>
<i>Cyanophyta</i>	<i>a</i>	<i>oui</i>	<i>Glycogène</i>
<i>Rhodophyta</i>	<i>a, d</i>	<i>oui</i>	<i>Amidon floridéen</i>
<i>Chlorophyta</i>	<i>a, b</i>	<i>non</i>	<i>Amidon</i>
<i>Euglenophytas</i>	<i>a, b</i>	<i>non</i>	<i>Amidon floridéen</i>
<i>Dinophytas</i>	<i>a, c2</i>	<i>non</i>	<i>Amidon</i>
<i>Cryptophyta</i>	<i>a, c2</i>	<i>oui</i>	<i>Amidon</i>
<i>Chrysophyta</i>	<i>a, c1, c2</i>	<i>non</i>	<i>Chrysolaminarane, Acides gras</i>
<i>Bacillariophyta</i>	<i>a, c1, c2</i>	<i>non</i>	<i>Chrysolaminarane, Acides gras</i>
<i>Xantophyta</i>	<i>a, c</i>	<i>non</i>	<i>Chrysolaminarane</i>
<i>Phaeophyta</i>	<i>a, c1, c2</i>	<i>non</i>	<i>Laminarane, Mannitol</i>

L'utilisation mondiale des algues tous secteurs confondus (consommation directe, extraction industrielle) consomme 3 mégatonnes de matière première dont 60% proviennent de cultures (Braud, 1992).

II - LES MACROALGUES

L'essentiel de la matière première pour l'industrie des macrophytes provient de cultures en mer ou bien en bassins ou lagunes (Braud, 1992). Une douzaine d'algues est consommée directement sans transformation majeure. en tête, on trouve le *Porphyra* (Nori) qui représente 40000 tonnes par an et un marché de 2 milliards de dollars, ensuite l'*Undaria pinnatifida* (Wakame) avec 20000 tonnes par an et un marché de 600 millions de dollars, et la *Laminaria japonica* (Kombu) qui représente aussi 600 millions de dollars de parts de marché.

Les macroalgues sont également la source de différentes substances dont certaines sont commercialisées et largement utilisées en industrie. Il s'agit surtout des

phycocolloïdes, et pour une part beaucoup plus modeste quelque protéines pigmentaires, et des molécules bioactives.

A - Les phycocolloïdes

Les phycocolloïdes à vocation agroalimentaire (alginates, carraghénanes et agars) représentent les produits majeurs extraits des macroalgues et une commercialisation significative. Ils dominent le marché avec un chiffre d'affaire d'environ 3,4 milliards de francs (Braud, 1992). Ces trois polymères algaux sont les plus exploités industriellement; leur utilisation dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, la production végétale ou la chimie fine les place au premier plan dans la production d'épaississants, de gélifiants, de stabilisants et d'excipients (Mabeau et coll., 1990a).

1 - Les alginates

Ce sont des polymères constitués par un mélange de deux acides uroniques, l'acide β 1,4-D-mannuronique et α 1,4-L-glucuronique en proportions variables (figure 1). Ils sont issus des algues brunes, plus particulièrement des laminaires (*Laminaria digitata*, *L. saccharina*, *L. hyperborea*), de *Macrocystis pyrifera* et d'*Ascophyllum*. Ils représentent 27000 tonnes pour une récolte de 170000 tonnes de matière sèche et une valeur marchande de 230 millions de dollars (Radmer, 1996). La production française des alginates est de 3000 tonnes avec un chiffre d'affaire global de 145 millions de francs qui place la France au quatrième rang mondial. Les alginates sont utilisés essentiellement dans le textile, l'agroalimentaire, l'industrie du papier et l'industrie pharmaceutique. La propriété particulière des alginates se traduit par la formation d'une structure dite en « boîte à œufs » en présence des ions bivalents tels que le Ca^{2+} qui forme des liaisons ioniques avec les acides uroniques de ces polymères (figure 2).

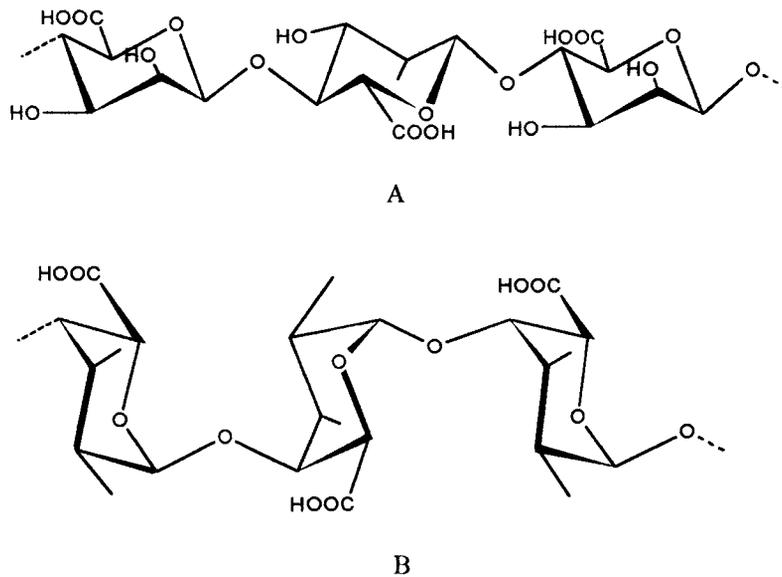


Figure 1 : Structure secondaire de l'acide alginique.
 A) acide polymannuronique ; B) acide polyglucuronique

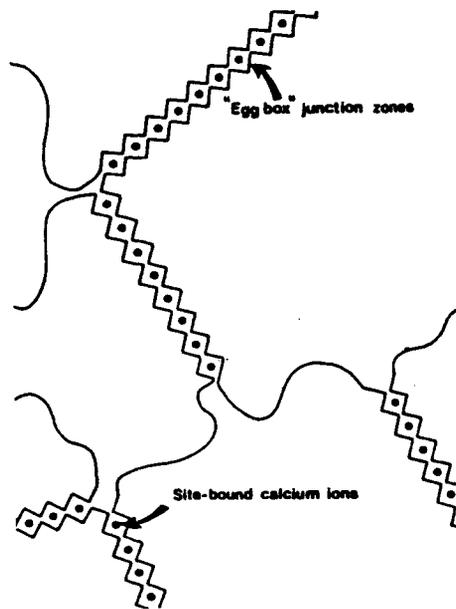


Figure 2 : Représentation schématique du modèle « boîte à œufs » de Rees (1969) montrant le mécanisme de précipitation de l'alginate en présence du calcium

2 - Les carraghénanes

C'est un groupe complexe de polysaccharides caractérisés par la répétition d'un dimère (D-galactose-D-galactose) lié alternativement par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ et $\alpha(1\rightarrow3)$. La présence ou l'absence du pont 3,6-anhydro-D-galactose, le nombre et la position des substituants sulfates sur les carbones des galactoses, permettent de classer les

différentes familles de ces polymères (figure 3). Les carraghénanes sont issus des algues rouges macrophytes (*Eucheuma cottonii*, *Chondrus crispus* et *Eucheuma spinosium*). Ce sont des galactanes hautement sulfatés (20 à 38%). Huit catégories principales de carraghénanes sont actuellement définies : μ , ν , κ , ι , ζ , λ , θ et ω -carraghénanes réparties en deux familles majoritaires : la famille des κ à propriétés gélifiantes et la famille des λ à propriétés épaississantes. Les trois catégories commercialisées sont : κ , λ et ι -carraghénanes. 15500 tonnes sont produites par an représentant 100 millions de dollars de valeur marchande (Jensen, 1993). La production française de carraghénanes est de 3400 tonnes ; cela représente 14% de la production mondiale et un chiffre d'affaire global de 216 millions de francs plaçant la France au troisième rang mondial. L'utilisateur principal des carraghénanes est l'industrie agroalimentaire. Les kappa-carraghénanes et iota-carraghénanes sont utilisés comme gélifiants, les lambda-carraghénanes comme épaississants.

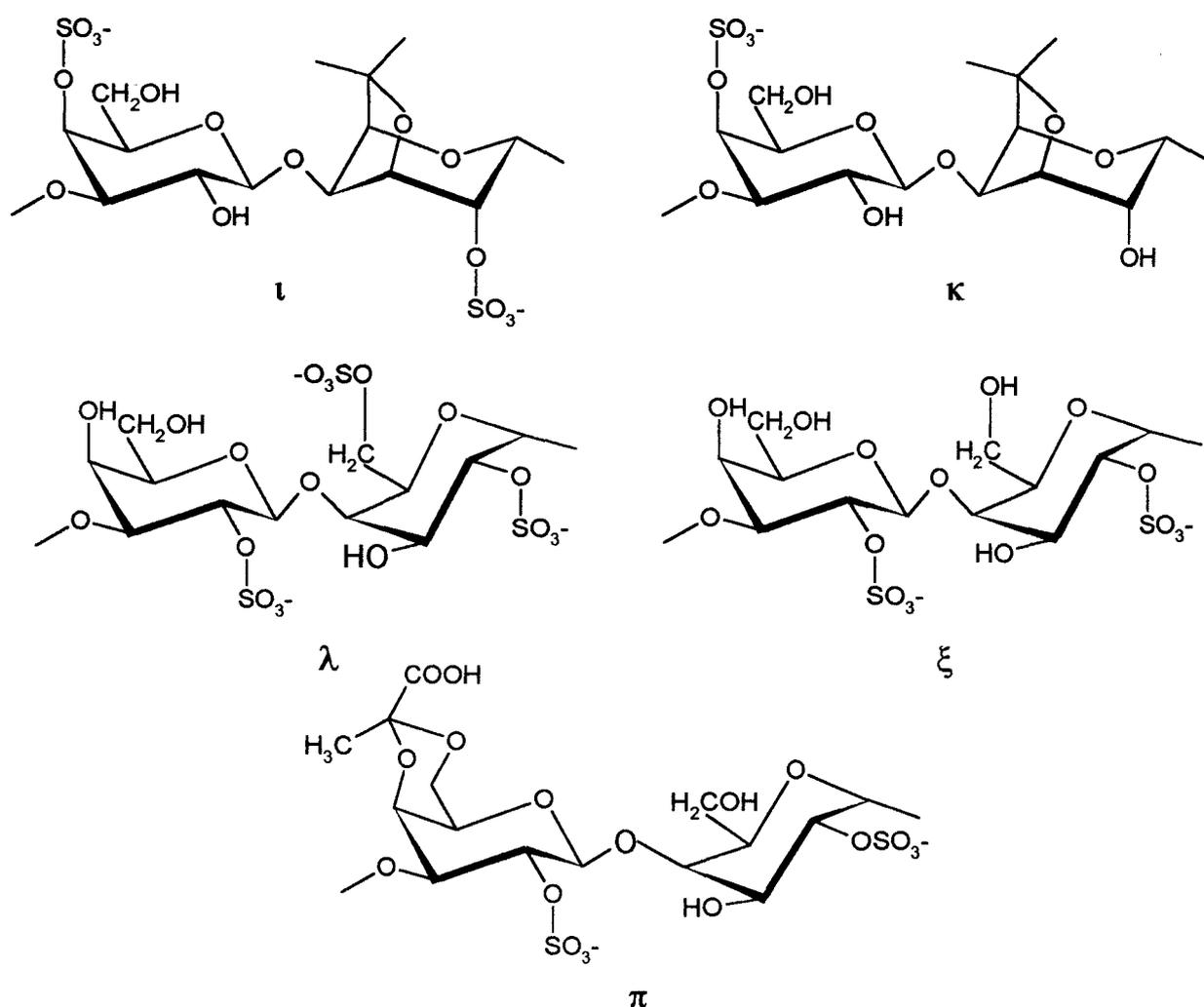


Figure 3 : Structures des unités disaccharidiques répétitives dans les différents types de carraghénanes : ι , κ , λ , ξ , π

3 - Les agars

Le groupe des agars représente une vaste gamme de polysaccharides constitués principalement d'une unité disaccharidique répétitive O- α -(D-galactose- β (1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro-L-galactose (figure 4). Ces polymères sont plus ou moins sulfatés, méthylés, pyruvatés selon leur origine macroalgale et la nature du procédé d'extraction (Mollet et coll., 1998). La substitution de l'agar par le 4-O-Méthyl-L-galactose a été montrée par Karamanos et collaborateurs en 1989. Les agars sont extraits principalement à partir des algues macrophytes Rhodophyta telles que *Gelidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia*, *Acanthopeltis* et *Ahnfeltia*. Leurs propriétés gélifiantes sont dues aux conformations hélicoïdales de portions des chaînes polysaccharidiques en milieu aqueux (figure 5). Environ 11000 tonnes sont extraites par an représentant une valeur de 160 millions de dollars. L'agarose est le chef de file de ces composés. Il possède la plus haute valeur ajoutée. La France fournit peu d'algues agarophytes et moins de 1% de la production mondiale avec 100 tonnes d'agar qui génèrent un chiffre d'affaire global de 20 millions de francs et situent la France au neuvième rang mondial. Les principaux utilisateurs d'agars sont les industries agroalimentaire et pharmaceutique. L'agar constitue un outil de laboratoire, comme support aussi bien de culture que d'autres techniques dans le domaine biotechnologique et biochimique. Chaque utilisation nécessite une qualité d'agar particulière.

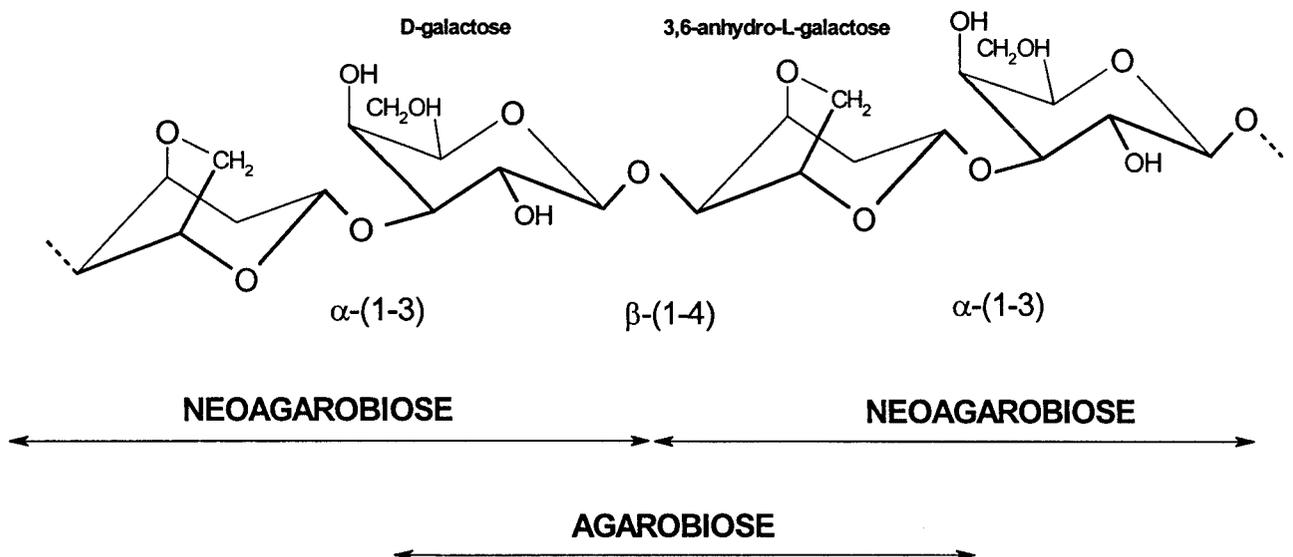


Figure 4 : Représentation schématique du polymère d'agarose et dénomination de ses dimères respectifs d'après Araki (1958)

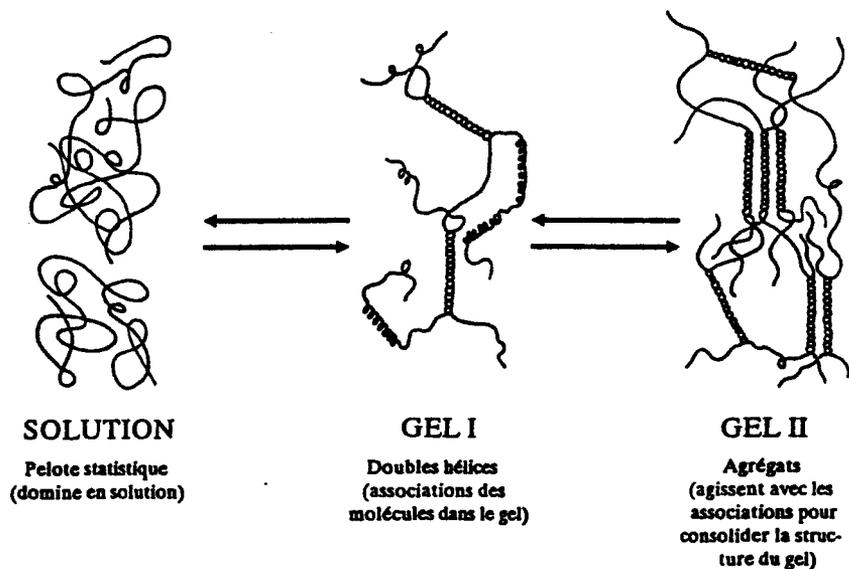


Figure 5 : Mécanisme de gélification de l'agarose d'après Arnott et collaborateurs (1974)

B - Les protéines

Les algues sont riches en protéines, leur consommation directe constitue un apport protéique essentiel chez les populations dont la ration alimentaire est pauvre en protéines d'origine animale. L'exploitation commerciale des protéines purifiées à partir des algues est largement dominée par les phycobiliprotéines. Ce sont des complexes pigments-protéines des algues rouges ; elles sont utilisées essentiellement dans le domaine biomédical, comme marqueur fluorescent. La R-phycoérythrine, isolée à partir du *Porphyra*, représente la substance majeure produite pour la commercialisation. Le prix de ces phycobiliprotéines purifiées peut dépasser 5000 dollars pour un gramme. Malgré ce prix très élevé, elles ne représentent que 2 millions de dollars par an sur le marché mondial (Radmer, 1996).

C - Les molécules bioactives

L'utilisation de certaines macroalgues brunes en Chine, pour le traitement du goître, datait du 16^{ème} siècle (Mabeau et coll., 1990b). Les préparations à base de colloïdes algaux sont préconisées pour leurs propriétés laxatives, indigestibles, hémostatiques et protectrices des muqueuses du tube digestif. Deux acides aminés algaux, l'acide kaïnique et l'acide domoïque (figure 6), possèdent des activités vermifuges et des propriétés neuroactives (Mabeau et coll., 1990b).

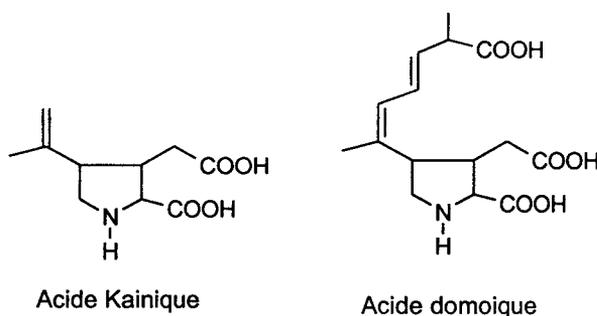


Figure 6 : Deux acides aminés d'origine algale : l'acide kaïnique et l'acide domoïque

Les autres produits tels que les farines et les liquides fertilisants, représentent quelques millions de dollars.

III - LES MICROALGUES

Les microalgues constituent d'excellents convertisseurs d'énergie solaire et sont des producteurs d'un grand nombre de métabolites dont les caractéristiques physico-chimiques, procurent un intérêt industriel (figure 7).

Les microalgues restent un groupe de microorganismes largement inexploré (probablement moins de 1% des espèces identifiées), comparé à d'autres microorganismes tels que les bactéries et les levures qui sont fortement étudiées pour la recherche de métabolites d'intérêt pharmaceutique et économique. En effet, les bactéries et les levures ont l'avantage d'être facilement cultivables en bioréacteur et

possèdent une vitesse de croissance plus rapide par rapport aux microalgues. Il n'en reste pas moins que ces dernières présentent un grand réservoir de produits potentiellement intéressants pour des applications variées et le fait d'être faiblement explorées leur donne un certain avantage.

Il existe deux types d'exploitations des microalgues : l'utilisation directe de la biomasse cellulaire et la valorisation des substances extraites à partir de la biomasse, ou excrétées par les cellules dans le milieu de culture.

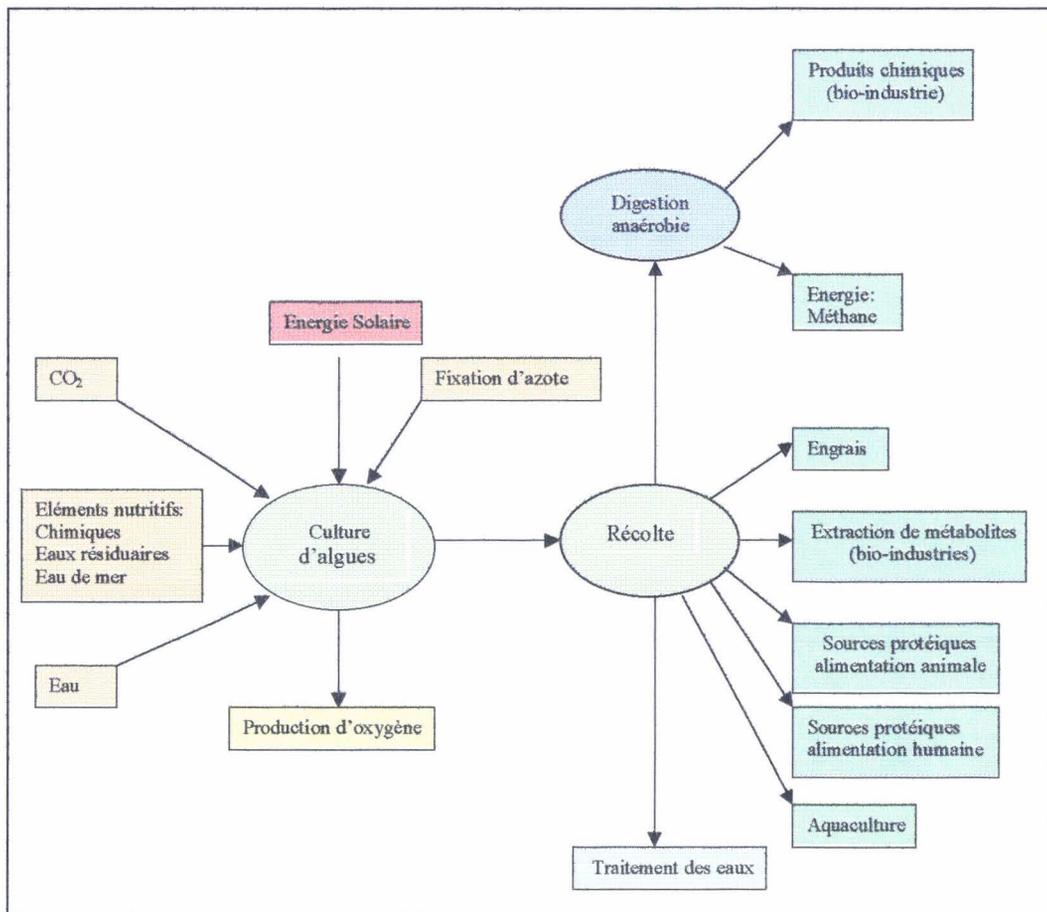


Figure 7 : Différents domaines d'application des microalgues d'après Callegari (1989)

A - Les produits à potentialités économiques issus des microalgues

A l'opposé des macroalgues qui peuvent être obtenues aussi par récolte dans leur milieu naturel, les microalgues sont exclusivement produites en culture, soit en plein air soit dans des fermenteurs dans des conditions stériles et contrôlées (Callegari, 1989).

Ces productions nécessitent des technologies coûteuses et difficiles à maîtriser. Pour une bonne rentabilité, la production est orientée vers des composés à très haute valeur ajoutée, tels que les caroténoïdes comme le β -carotène et l'astaxanthine ou les acides gras polyinsaturés comme l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (Gudin, 1989). Le β -carotène est le principal pigment produit à partir des microalgues, malgré son existence chez les plantes supérieures et la possibilité de le synthétiser à moindre coût par voie chimique. Le β -carotène de synthèse possède un prix de vente d'environ 600 dollars alors que le produit naturel se vend aux alentours de 1400 dollars le Kg (Radmer et Parker, 1994).

D'autres métabolites issus des microalgues intéressent les industriels : les lipides (Barclay et coll., 1994 ; Shiran et coll., 1996 ; Khozin et coll., 1997 ; Qiang et coll., 1997), les hydrocarbures, les vitamines, les osmorégulateurs, les pigments (Glazer, 1994), les composés biologiquement actifs (Gerwick et coll., 1994 ; Running et coll., 1994) et les polysaccharides (Gudin et Thepenier, 1986 ; Gudin, 1987).

1 - Vitamines, caroténoïdes, acides gras et hydrocarbures

Les microalgues sont une source de nombreuses molécules bioactives telles que les vitamines D, E, B1, B12, B6, la pro-vitamine A (β -carotène), la Riboflavine, la Niacine, l'Acide folique, la Biotine et les acides gras (Borowitzka, 1988a, 1988b, 1988c).

L'acide ascorbique ou vitamine C est produite en grande quantité par *Chlorella pyrenoidosa* (40 mg par litre de culture). Après modification génétique, une souche de *Chlorella* peut produire jusqu'à 1,8 g/l d'acide L-ascorbique intracellulaire (Running et coll., 1994). La vitamine C est très labile au contact de l'oxygène ; cela pose le problème de son extraction à partir de la biomasse.

Les microalgues marines sont des excellentes sources d'acides gras polyinsaturés tels que l'acide linoléique $C18 :2\omega9$, l'acide γ -linoléique $C18 :3\omega8$, l'acide arachidonique $C20 :4\omega5$, l'acide eicosapentaénoïque $C20 :5\omega3$ (EPA) et l'acide docohexaénoïque $C22 :6\omega3$ (DHA) (Borowitzka, 1988c ; Cohen & Cohen, 1991 ; Becker, 1994). Ces acides gras essentiels ont une importance dans le traitement et la prévention de certaines maladies telles que l'artériosclérose, ainsi que dans la nutrition humaine (Yongmanitchai et coll., 1989).

Des hydrocarbures peuvent être extraits de deux souches de *Botryococcus braunii* (algue verte), l'une produisant un mélange de 3 Alcadiènes C27, C29, C31, représentant plus de 30% de sa biomasse sèche totale, l'autre produisant le Botriococcène qui est un isoprène de 30 à 37 carbones (Metzger et Casadevall, 1983 ; Casadevall et coll., 1985 ; Gudin et Thepenier, 1986 ; Borowitzka, 1988b).

2 - Les osmorégulateurs

De nombreuses microalgues capables de se développer dans des milieux de salinité variable, possèdent des systèmes d'osmorégulation qui intéressent l'industrie. La production de glycérol par différentes souches de *Dunaliella* en Israël (Ben Amotz et Avron, 1980) dans les industries « Koor », et la production de L-proline à partir de *Chlorella* sp. par la compagnie « Ethyl Corporation » aux U.S.A. (Leavitt, 1983), ont fait l'objet de projets mais qui ont été abandonnés par les industriels.

3 - Les pigments

Certaines industries telles que celles de l'alimentation ou de la cosmétologie, s'intéressent aux pigments des microalgues en tant qu'agents colorants. Ceux qui retiennent le plus l'intérêt sont principalement les phycoérythrine, pigments fluorescents (déjà commercialisés et utilisés comme immunotraceurs) (Glazer, 1994), les phycocyanines et l'astaxanthine. On trouve respectivement ces pigments chez *Porphyridium cruentum*, *Porphyridium aerugineum* (Gantt, 1990) et *Haematococcus pluvialis* (Borowitzka, 1988a).

4 - Les composés biologiquement actifs de types antibiotiques, antifongiques et toxines

L'origine des antibiotiques est principalement terrestre. Sur 13500 antibiotiques connus, 5500 sont produits par des actinomycètes, 3300 par des plantes supérieures. Environ 90 sont utilisés en médecine (Borowitzka, 1995). Dès les années 50, on a commencé à tester *in vitro* l'activité biologique des substances issues des algues. Dans les années 70, la société Roche Research Institute of Marine Pharmacology (RRIMP) a développé un vaste programme de recherche sur la bioactivité des substances issues des algues. Les microalgues n'ont fait l'objet de recherches dans ce domaine qu'à partir des années 80, notamment en 1988 par Moore et collaborateurs, en 1989 par Kellam et Walker et en 1991 par Patterson et collaborateurs.

L'utilisation des microalgues est désormais courante. En effet, de nombreuses espèces sont explorées en vue de mettre en évidence des principes actifs aussi variés que les antimicrobiens, les antiviraux, les anticoagulants, les anti-tumoraux et les toxines. La complexité structurale de ces molécules rend leur synthèse chimique très peu probable.

a - Antimicrobiens

De nombreuses microalgues produisent un certain nombre d'antimicrobiens (antibiotiques, antifongiques, antialgaux, antiprotozoaires). La plupart de ces substances a une identité et une structure encore méconnues et leur application dans le domaine médical est encore au stade expérimental (tableau 2).

Tableau 2 : Activité antibiotique des extraits d'algues marines sur certaines bactéries d'après Borowitzka (1995)

	<i>Streptococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyrogènes</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Nombre d'extraits testés</i>	435	352	353	438	439
<i>Extraits actifs in vitro</i>	86	124	138	18	19
<i>Testée in vivo</i>	44	43	76	10	16
<i>Extraits actifs in vivo</i>	5	4	2	0	0

b - Activité antivirale

Gustafson et collaborateurs (1989) ont mis en évidence l'activité antivirale des molécules sulfatées d'origine microalgale. De façon plus générale, les substances chargées négativement, dites polyanioniques, inhiberaient la réplication *in vitro* du virus d'immunodéficience humaine (VIH) responsable du SIDA. Ayehunie et collaborateurs (1996) ont mis en évidence une activité anti-VIH-1 dans un extrait de cellules de *Spirulina platensis*.

c - Toxines et activité pharmacologique de substances algales

La saxitoxine, rencontrée chez de nombreuses dinoflagellées, bloque l'influx nerveux. Elle est utilisée dans certaines microchirurgies. Les toxines d'origine algale sont aussi des molécules de base pour l'étude de la relation « structure activité » de certains principes actifs et pour l'étude de la régulation cellulaire.

B - L'utilisation directe de la biomasse

Les microalgues sont consommées pour leur apport en protéines. Les algues telles que les *Chlorella* (Japon) ou *Spirulina* (Martinique, USA, Israël, Mexique, Japon, Taiwan), sont cultivées spécialement pour l'alimentation humaine (Sautier, 1995). En Italie, Torzillo et collaborateurs (1986) ont développé la culture de *Spirulina* dans des photobioréacteurs fermés. Les pays de l'Asie Pacifique ont une capacité de production de microalgues d'environ 500 tonnes par an (Lee, 1997). *Nostoc* et *Phyllocladon* sont consommées dans les zones asiatiques et indiennes (Bonin, 1983). Dans ces régions, les microalgues sont essentiellement utilisées comme complément alimentaire, commercialisées sous forme de poudre ou de composés déshydratés. La composition en acides aminés varie selon l'espèce, le moment et l'endroit de récolte, et les conditions de culture. Les protéines algales présentent un léger déficit en lysine et en acides aminés soufrés ; l'apport protéique dans une ration alimentaire ne peut être donc complètement couvert par une source exclusivement algale.

Les algues unicellulaires peuvent servir de nourriture aux larves d'*Ostrea edulis*. L'apport d'algues unicellulaires ou "algues fourrages" constitue la technique la plus courante pour alimenter les jeunes larves de bivalves marins. L'ajout de 1% de biomasse sèche de la microalgue *Nannochloropsis* à l'alimentation de poules pondeuses augmente de 35% la teneur en acides gras de type ω -3 polyinsaturés dans le jaune d'œuf (Nitsan et coll., 1998).

Dans le domaine de l'épuration des eaux usées, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* sont plus particulièrement utilisées (Oswald, 1988). La biomasse algale est aussi utilisée dans des installations pilotes de méthanisation (Balloni et coll., 1982 ; Gudin et Thepenier, 1986). Les possibilités d'utilisation des microalgues en tant que fertilisateurs ou stabilisateurs des sols, font actuellement l'objet d'une recherche accrue par des compagnies telles que Cyanotech (Woodinville, Washington), Soil Technologies (Fairfield, Iowa) et R. et A. Plant Soil (Pasco, Washington). Des produits qui permettent d'augmenter le rendement des productions agricoles sont à l'heure actuelle commercialisés par ces entreprises (Barclay et Lewin, 1985).

IV - LES ALGUES ROUGES (RHODOPHYTA)

A - La classification des Rhodophytes

La division Rhodophyta contient deux classes, la classe des Bangiophycideae subdivisée en trois ordres et six familles et la classe des Floridophycideae comprenant dix ordres et 23 familles (tableau 3).

Tableau 3 : Classification de la division des Rhodophyta (d'après Van den Hoek et coll., 1996).

Division : Rhodophyta

<i>classe : Bangiophycideae :</i>	<i>classe : Floridophycideae :</i>	
<i>Ordre 1 : Porphyridiales</i>	<i>Ordre 1 : Batrachospermales</i>	<i>Ordre 7 : Corallinales</i>
<i>Famille 1 : Porphyridiaceae</i>	<i>Famille : Batrachospermaceae</i>	<i>Famille : coralinaceae</i>
<i>Famille 2 : Goniotrichaceae</i>	<i>Ordre 2 : Palmariales</i>	<i>Ordre 8 : Gigartinales</i>
<i>Ordre 2 : Compsopogonales</i>	<i>Famille : Palmariaceae</i>	<i>Famille 1 : Solieriaceae</i>
<i>Famille 1 : Compsopogonaceae</i>	<i>Ordre 3 : Nemaliales</i>	<i>Famille 2 : Gigartinaceae</i>
<i>Famille 2 : Erythropeplidaceae</i>	<i>Famille 1 : Acrochaetiaceae</i>	<i>Famille 3 : Phyllophoraceae</i>
<i>Famille 3 : Boldiaceae</i>	<i>Famille 2 : Nemaliaceae</i>	<i>Famille 4 : Gracilareaceae</i>
<i>Ordre 3 : Bangiales</i>	<i>Famille 3 : Helminthocladiaceae</i>	<i>Ordre 9 : Rhodymeniales</i>
<i>Famille : Bangiaceae</i>	<i>Famille 4 : Chaetangiaceae</i>	<i>Famille 1 :</i>
	<i>Ordre 4 : Gelidiales</i>	<i>Famille 2 : Champiaceae</i>
	<i>Ordre 5 : Bonnemaisoniales</i>	<i>Ordre 10 : Ceramiales</i>
	<i>Famille : Bonnemaisoniaceae</i>	<i>Famille 1 : Ceramiaceae</i>
	<i>Ordre 6 : Cryptonemiales</i>	<i>Famille 2 : Dasyaceae</i>
	<i>Famille 1 : Dumontiaceae</i>	<i>Famille 3 : Delesseriaceae</i>
	<i>Famille 2 : Glosiphoniaceae</i>	<i>Famille 4 : Rhodomelaceae</i>
	<i>Famille 3 : Cryptonemiaceae</i>	
	<i>Famille 4 : Kallymeniaceae</i>	
	<i>Famille 5 : Choreocolaceae</i>	

B - La microalgue Rhodella violacea

1 - Origine

Rhodella violacea est une archéthalle unicellulaire non mobile (coccoïde) appartenant à la division Rhodophyta, à la classe des Bangiophycideae, à l'ordre des Porphyridiales et la famille des Porphyridiaceae. Elle a été décrite pour la première fois par Kornmann (1965) et nommée *Porphyridium violaceum*. Puis Wehrmeyer en 1971 l'a renommée *Rhodella violacea* à cause de plusieurs caractères ultrastructuraux frappants qui

suggèrent une affinité beaucoup plus proche du genre *Rhodella* que du genre *Porphyridium* (Gantt et Conti, 1965 ; Gantt et coll., 1968).

Les cellules de *Rhodella violacea* ont une couleur allant du violet au rouge-brun suivant l'âge et les conditions de culture, et un diamètre allant de 8 μm à 14 μm (en moyenne 10 μm). Elles sont entourées par un mucilage extracellulaire d'épaisseur variable.

Des observations détaillées en microscopie électronique ont été réalisées récemment par Patrone et collaborateurs (1991). Le noyau occupe une position excentrée dans la cellule. Une région de la membrane nucléaire est toujours en contact avec l'enveloppe du chloroplaste par l'intermédiaire du pyrénioïde. Ces deux enveloppes ne sont jamais accolées ; on observe toujours un espace d'environ 30 nm. Dans certaines cellules de *Rhodella violacea*, il existe des connexions tubulaires de 12 à 14 nm, régulièrement espacées, qui mettraient semble-t-il, en connexion directe le noyau et le pyrénioïde.

Le volume cellulaire est largement occupé par un chloroplaste unique, multilobé, dont un des lobes est en continuité avec le pyrénioïde localisé près du centre de la cellule.

Les mitochondries et les dictyosomes sont localisés préférentiellement à la périphérie de la cellule.

2 - La pigmentation chez *Rhodella violacea*

La couleur rouge des algues Rhodophyta est due à la présence de la phycoérythrine, pigment hydrosoluble généralement dominant. La présence de deux autres pigments hydrosolubles, la phycocyanine et l'allophycocyanine de couleur bleue, peut quelquefois nuancer cette couleur rouge si celles-ci sont présentes en proportion favorable à leur teinte, comme c'est le cas chez certaines espèces. Ces pigments existent sous forme liée aux protéines, ce qui forme un complexe hémisphérique, le phycobilisome (figure 8) qui est lié aux membranes thylakoïdales, où il joue le rôle d'antenne collectrice des photons pour les acheminer vers le photosystème II (PSII). Le photon provoque l'excitation de la phycoérythrine qui va transmettre l'énergie absorbée aux phycocyanines et aux allophycocyanines puis aux complexes chlorophylliens sous-jacents. Ce transfert d'énergie s'effectue avec des pertes minimales car la distance parcourue est extrêmement réduite. La quantité de pigments varie en fonction de l'intensité lumineuse à laquelle sont exposées les cellules. En effet, les phycobiliprotéines diminuent sous forte intensité lumineuse (Jahn et coll., 1984). La

phycobiliprotéines diminuent sous forte intensité lumineuse (Jahn et coll., 1984). La carence en azote induit une mobilisation de protéines constituant les phycobilisomes et provoque une chute de la quantité des phycobiliprotéines et du rapport phycoérythrine/chlorophylle (PE/Chl) et le verdissement des cultures. La levée de cette carence permet le rétablissement de l'état cellulaire normal et le rapport PE/Chl initial.

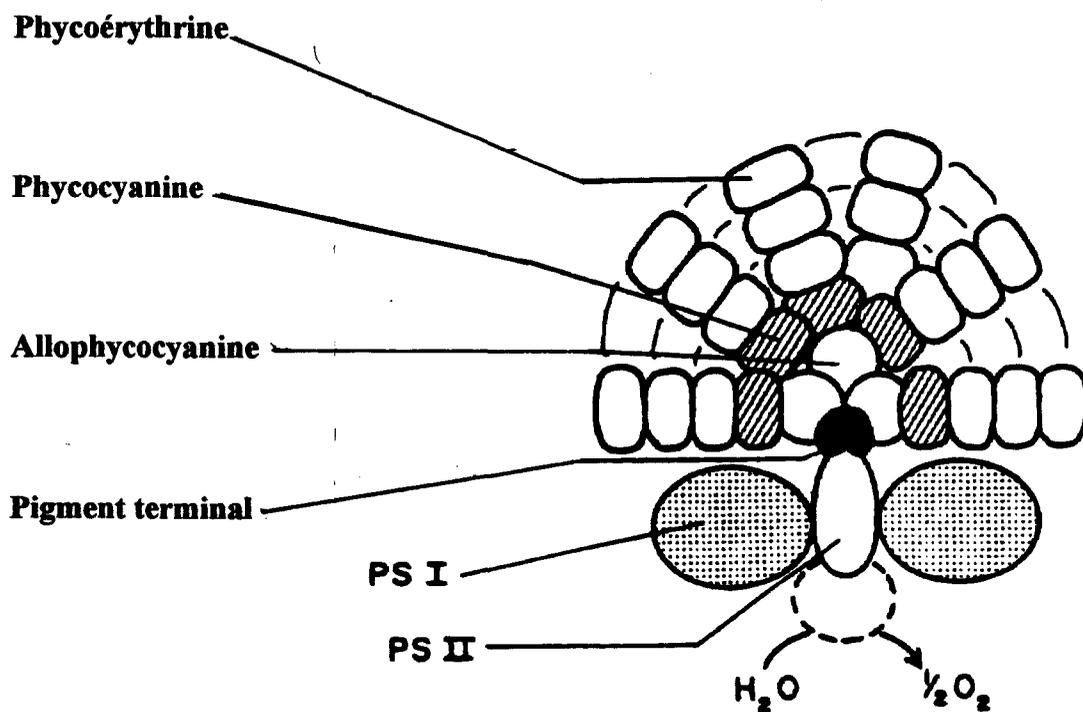


Figure 8 : Représentation hypothétique de la structure globulaire d'un phycobilisome de Porphyridium purpureum (d'après Gantt, 1990)

CHAPITRE I

**INFLUENCE DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES
(L'AZOTE, LA TEMPERATURE ET LA LUMIERE) SUR
LE COMPORTEMENT DE *R. VIOLACEA* EN
CROISSANCE, EN CULTURE NON RENOUVELEE**

I - INTRODUCTION

La distribution des algues dans le milieu naturel est très variée ; elle va des zones photiques des océans occupées par les algues phytoplanctoniques, aux zones benthiques des ceintures littorales occupées par les algues macrophytes. Cette large répartition implique de grandes facultés d'adaptation aux variations des différents paramètres de l'environnement. Les organismes photosynthétiques marins ont adapté leur appareil photosynthétique à la quantité de lumière à laquelle ils sont exposés ainsi qu'à ses propriétés spectrales. En effet, le flux quantique varie en qualité et en quantité dans le milieu marin selon la profondeur et la turbidité de l'eau. En surface, ce sont les radiations lumineuses rouges qui prédominent alors que les bleues et les vertes sont majoritaires en profondeur. Pour une utilisation optimale de ces radiations, les algues possèdent différents systèmes pigmentaires de capture des photons. Ainsi, les algues rouges (Rhodophycophyta) et brunes (Phéophycophyta) possèdent, en plus de la chlorophylle *a*, pigment essentiel à la photosynthèse, des pigments collecteurs particuliers (caroténoïdes et chlorophylle *c* chez Phéophyta, phycobiliprotéines chez les Rhodophyta) leur permettant de capter efficacement les radiations lumineuses qui leur parviennent.

Le processus photosynthétique oxygénique chez les Rhodophyta met en œuvre le transfert des photons au photosystème II via le phycobilisome. Ensuite, l'énergie lumineuse absorbée est convertie en énergie chimique sous forme d'ATP et de NADPH,H⁺ (figure 9) ; cette énergie sera ensuite utilisée pour la réduction de dioxyde de carbone et la synthèse de divers métabolites cellulaires.

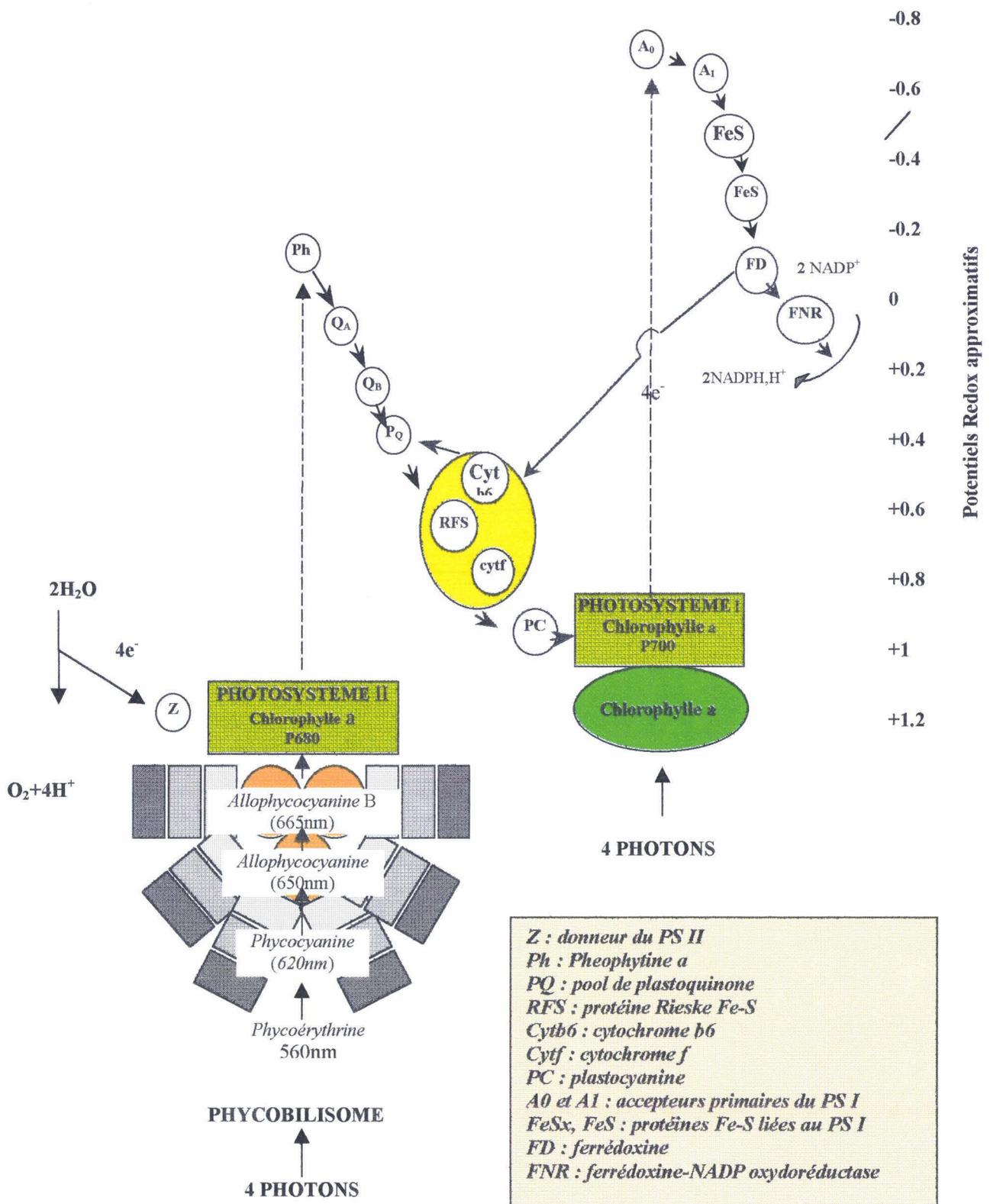


Figure 9 : Chaîne de transfert des électrons dans le mécanisme photosynthétique chez les organismes à phycobilisomes

Les composants du complexe PSII et son architecture au sein de la membrane thylacoïdale (figure 10) sont largement étudiés.

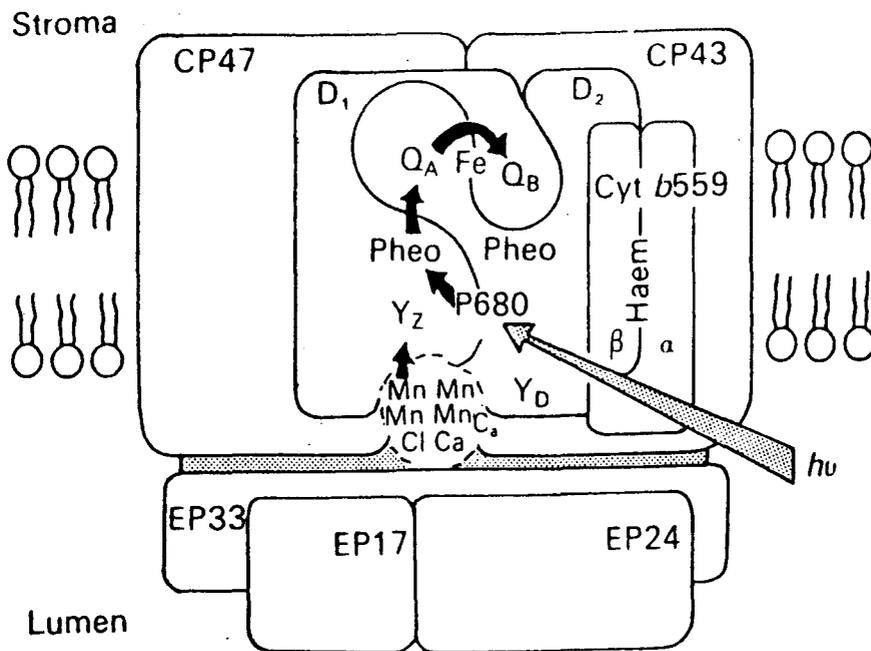


Figure 10 : Représentation schématique des composants principaux et de la séquence du transfert d'électrons du complexe PSII

L'activité photosynthétique est le processus physiologique le plus affecté chez les plantes lors des changements de paramètres environnementaux. Dans ce chapitre, nous étudierons les réponses physiologiques de *R. violacea* en culture non renouvelée, aux variations de quelques paramètres écophysologiques tels, que la concentration en azote, la température, l'intensité lumineuse.

II - MATERIEL ET METHODES

A - Matériel biologique

Rhodella violacea (Kornmann) cultivée dans notre laboratoire est la souche de Wehrmeyer qui provient de l'île de Sylt, au nord de l'Allemagne.

B - Milieu de culture

Les cellules de *R. violacea* sont cultivées dans un milieu d'eau de mer artificielle (EMA) (Jones and coll., 1963) (annexe 1). Toutes nos cultures ont été effectuées en milieu non renouvelé dans des fioles Erlenmeyer de 3 litres contenant 2 litres de milieu de culture. L'apport de CO₂ et l'agitation sont assurés par un bullage d'air stérilisé par filtration sur des filtres de maille 0,2 µm. Les cultures sont éclairées par des rampes de tubes fluorescents de type « grolux 40 W » (MAZDA) avec une intensité lumineuse de 150 µmol photons.m⁻².s⁻¹. Les photopériodes sont régulées en fonction des études effectuées. Les conditions de température sont assurées par des chambres climatisées.

C - Analyse des pigments liposolubles chez *Rhodella violacea*

1 - Extraction et séparation des pigments

L'extraction pigmentaire est effectuée sur des cellules fraîches à l'aide d'un mélange méthanol / dichlorométhane 3/1 (v/v). La séparation des pigments est réalisée par une HPLC en phase inverse, munie d'une colonne C18 Zorbax et d'un détecteur à barettes de diodes. L'élution est effectuée par le mélange dichlorométhane, méthanol, acétonitrile, selon un gradient discontinu.

2 - Analyse qualitative des pigments séparés par HPLC

L'identification des pigments en sortie de colonne est effectuée par la comparaison de leur spectre d'absorption obtenu entre 350 et 780 nm avec les spectres des pigments standard.

D - Influence de la concentration initiale en azote sur la croissance de *R. violacea*

1 - Milieu de culture

Pour cette expérience, nous utilisons le milieu de culture eau de mer enrichie (Provasoli, 1968) dont la concentration normale en azote est de 70 mg/l (annexe 2). Nous avons utilisé trois concentrations initiales en azote (NaNO_3) : 35 mg/l, 70 mg/l et une concentration trois fois plus élevée de 210 mg/l.

2 - Dénombrement des cellules

Le dénombrement des cellules est effectué directement sous microscope optique à l'aide d'une cellule de Thomas à réseau double.

Le nombre de cellules par ml de suspension d'algue est calculé en effectuant la moyenne de cinq répétitions.

E - Mesure de la fluorescence de la chlorophylle

1 - Principe

L'énergie lumineuse absorbée par les pigments met en route tous les processus photochimiques qui conduisent à la photosynthèse (figure 9).

Lorsqu'une molécule de chlorophylle reçoit de la lumière, elle passe à un niveau énergétique supérieur : elle se trouve alors dans un état dit «état excité». Cet état n'est pas stable et le retour à l'état fondamental s'effectue rapidement en libérant l'énergie absorbée suivant plusieurs voies :

1. l'énergie libérée peut être transférée à une autre molécule qui l'accepte et déclenche à terme les réactions photochimiques induisant le transport photosynthétique des électrons ;
2. elle peut être dissipée sous forme de chaleur ;
3. elle peut être réémise sous forme d'un photon de moindre énergie : ce phénomène est appelé fluorescence.

Ces différents processus sont compétitifs : les changements du rendement photosynthétique et/ou de la dissipation thermique provoqueront des variations complémentaires de l'émission de fluorescence. La mesure de la fluorescence fournit donc les informations sur l'ensemble des aspects de la photosynthèse et sur la réponse des plantes ou des algues aux stress dus aux facteurs environnementaux et à la disponibilité des substances nutritives. De ce fait, la fluorescence chlorophyllienne peut être utilisée comme une sonde intrinsèque du système photosynthétique.

2 - Niveaux de fluorescence F₀, F_m et F_v

Les cellules de *R. violacea* sont mises à l'obscurité pendant 15 min ; ensuite elles sont illuminées par une lumière modulée ; la fluorescence augmente immédiatement et atteint un niveau minimum appelé F₀ qui correspond à la fluorescence émise par les chlorophylles non connectées aux antennes collectrices. Au niveau F₀, tous les accepteurs d'électrons sont oxydés et les centres réactionnels sont dits alors "ouverts".

Dès que la chlorophylle a du centre réactionnel est excitée, le transfert de charge commence et la quinone Q_A est réduite. Les électrons sont ensuite pris en charge par les autres accepteurs d'électrons. Lorsque toutes les quinones sont réduites, les chlorophylles a des centres réactionnels ne peuvent plus transférer les électrons et ne peuvent donc plus être excitées. On dit alors que les centres sont "fermés" (cet état est provoqué par une lumière saturante). A cette étape, la probabilité de dissipation de l'énergie excitatrice des chlorophylles a est la plus grande et la fluorescence atteint son niveau maximum, appelé F_m.

F_v est la différence entre F_m et F₀. Elle exprime le nombre de centres réactionnels fonctionnels (qui se sont fermés par la lumière saturante) (figure 11).

3 - Mesures de fluorescence à l'aide du PAM.

Pour la détermination quantitative de la fluorescence, nous avons utilisé un fluorimètre à lumière modulée, le PAM-2000 (Pulse Amplitude Modulation fluorometer, Waltz GmBh).

Les algues sont placées pendant 15 minutes à l'obscurité. Ainsi, tous les accepteurs d'électrons sont oxydés et les centres réactionnels sont "ouverts".

Le niveau F0 est ensuite mesuré en déclenchant une lumière modulée très faible d'environ $6 \mu\text{mole photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ afin de conserver les centres réactionnels "ouverts". Dans ces conditions, les chlorophylles de l'antenne sont excitées mais aucune fluorescence variable n'est engendrée.

Puis le niveau Fm (fluorescence maximale) est obtenu en appliquant un éclair saturant ($730 \mu\text{mole photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durant 800 ms. Il induit la séparation de charges et "ferme" tous les centres réactionnels. Le rendement de fluorescence est maximum.

Le rapport F_v / F_m est calculé selon la courbe de réponse comme suit :

$$F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m \text{ (figure 11)}$$

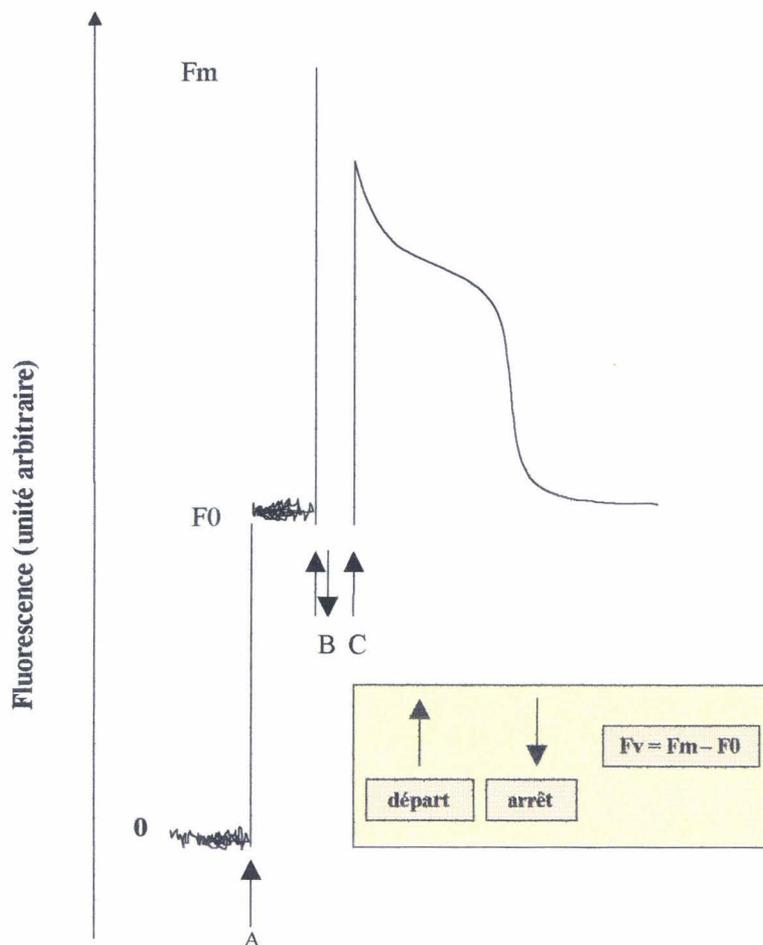


Figure 11 : Mode d'enregistrement et de calcul de la fluorescence à l'aide du P.A.M, (A) : départ lumière modulée, (B) : éclair-Flash saturant, (C) : lumière actinique non saturante

F - Le stress et la restauration

Les algues sont préalablement cultivées à 10, 20 et 30°C pendant 6 jours afin d'atteindre la phase exponentielle de croissance pour les trois conditions. Elles sont ensuite mises dans le « maturateur » (figure 12) dont la paroi double permet la régulation et le maintien de la température à 10, 20, ou 30°C durant toute l'expérience. La concentration cellulaire initiale pour les trois conditions est de $50 \cdot 10^4$ cellules/ml. Le stress des cellules est effectué pendant 5 heures par un éclairage d'intensité $928 \mu\text{mole photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Ensuite, les cellules sont soumises à un éclairage de faible intensité $50 \mu\text{mole photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pendant 24 heures ; des mesures de fluorescence sont effectuées à des intervalles non réguliers pendant les 24 heures.

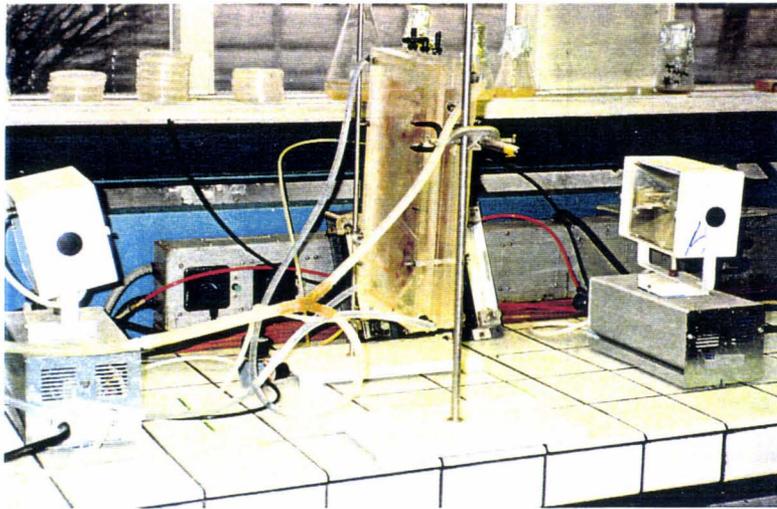


Figure 12 : Le maturateur en présence des deux sources de lumière Halogène, la suspension cellulaire, se trouve entre deux doubles parois thermostatées à l'aide de la circulation d'eau maintenue à la température désirée

G - Expérience de thermofluorescence

Pour estimer le degré d'adaptation des algues aux températures de culture de 10°C, 20°C et 30°C, on a effectué des mesures quotidiennes de la variation de la fluorescence fixe F0 des cellules soumises à un gradient de température entre 20 et 65°C.

La variation de la fluorescence F0 est mesurée par le Fluorimètre PAM 101-103 (Waltz Gombitt) combiné à la cellule d'échantillonnage couplée à un thermorégulateur à effet Peltier piloté par ordinateur. Le gradient de température est effectué de 20 à 65°C avec

une augmentation linéaire de 3°C par min. Avant toute mesure, les échantillons d'algues sont maintenus à l'obscurité pendant 15 min à leur température de culture respective. Chaque mesure est répétée 3 fois, la culture à 20°C est prise comme témoin.

H - Analyse des acides gras

1 - Extraction des lipides

L'extraction des lipides a été réalisée sur des cellules conservées par congélation à -30°C. Après chaque prélèvement quotidien, les algues sont plongées immédiatement quelques minutes dans l'azote liquide pour arrêter tous les processus métaboliques, puis elles sont conservées à -30°C jusqu'au moment de l'extraction.

Le milieu de culture est éliminé après décongélation par une centrifugation à 1200xg, 10 min à 4°C ; le culot cellulaire est repris dans un minimum d'eau distillée et les cellules sont cassées à l'aide de la presse de French avec une pression de 14000 bars.

Pour environ un gramme de culot cellulaire, on ajoute 3,75 ml de méthanol/chloroforme (2/1 ; V/V). Après une nuit à température ambiante, on centrifuge ; le surnageant S1 est conservé et le culot est repris par 4,75 ml de mélange méthanol/chloroforme/eau (2/1/0,8 ; V/V/V). On agite vigoureusement, puis on centrifuge 10 min à 1500xg ; le surnageant obtenu est réuni avec S1 et 2,5 ml d'eau puis 2,5 ml de chloroforme y sont ajoutés. L'ensemble est agité vigoureusement puis centrifugé pour séparer la phase aqueuse et la phase organique contenant les lipides qui sera prélevée et supplémentée de 20 µg d'un témoin interne d'acides gras (le C17 : 0). L'ensemble est séché sous un courant d'azote anhydre.

2 - Méthylation des acides gras

Pour hydrolyser les liaisons esters, libérer les acides gras et former les esters méthylés d'acides gras, nous utilisons un mélange méthanol/acide sulfurique (9,75/0,25 ; V/V). 3ml de ce mélange sont ajoutés aux résidus lipidiques secs ; le mélange est maintenu à 70°C pendant 45 min. En fin de réaction, les esters méthyliques d'acides gras sont extraits par 3 ml d'hexane.

3 - Séparation des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse

Les esters méthyliques d'acides gras sont séparés par chromatographie en phase gazeuse. Notre système est constitué par un appareil Shimadzu équipé d'une colonne capillaire à phase stationnaire polaire (BPX70, 30 m x 0.22 mm), d'un détecteur à ionisation de flamme. Le gaz vecteur est l'Hélium et la température est programmée de 140°C (5 min) à 240°C (5 min) en suivant un gradient linéaire à raison de 3°C/min. La température de l'injecteur et celle du détecteur sont respectivement 240°C et 280°C. L'analyse qualitative est basée sur les comparaisons avec les témoins commerciaux et l'analyse quantitative est basée sur le rapport des surfaces des pics correspondant à chaque acide gras identifié sur celle du pic correspondant au témoin interne (C17 : 0).

III - RESULTATS ET DISCUSSION

A - Analyse qualitative des pigments liposolubles chez *Rhodella violacea*

L'analyse qualitative des pigments extraits de *R. violacea* par HPLC en phase inverse a révélé la présence de la chlorophylle a, de la zéaxanthine, de l' α -carotène et du β -carotène.

B - Influence de la concentration initiale d'azote dans le milieu de culture sur la croissance de *R. violacea*

L'azote joue un rôle important dans le développement des algues. Sa concentration, comme la nature chimique sous laquelle il est incorporé dans le milieu de culture, peuvent influencer les qualités physiologiques des cellules. Chez *R. violacea*, une carence en azote provoque un verdissement des cellules du fait de la diminution de la quantité des phycobiliprotéines qui leur procurent la couleur rouge violacée (figure 13).



Figure 13 : *R. violacea* cultivée dans le milieu Provasoli comportant des concentrations initiales en azote de (NaNO_3) ; (1) : 35 mg/l ; (2) : 70 mg/l ; (3) : 210 mg/l, après 20 jours de culture ($150 \mu\text{mole photon cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, photopériode 16 h J/N, 20°C)

Les cellules de *R. violacea* ont été cultivées à 20°C dans le milieu Provasoli supplémenté de 70 et 210 mg/l d'azote. Les résultats des comptages quotidiens durant 20 jours de culture sont présentés dans la figure 14.

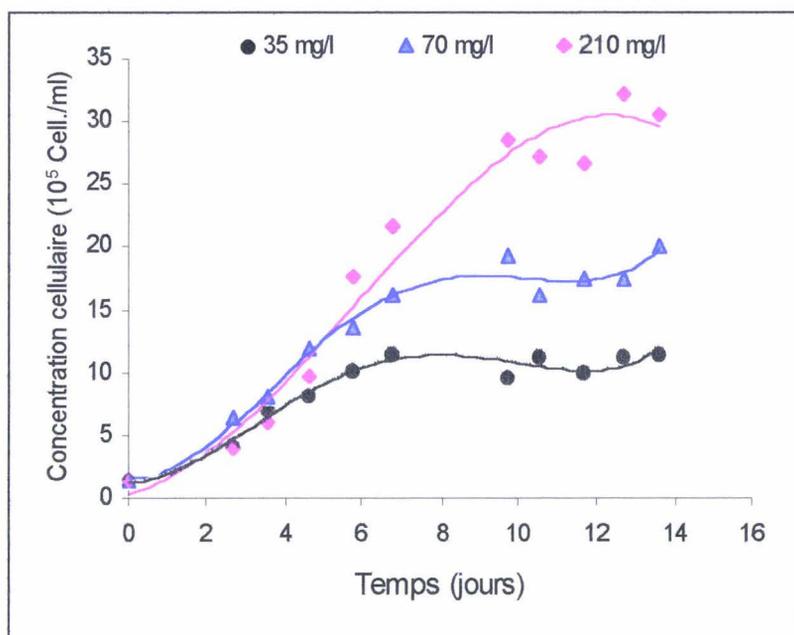


Figure 14 : Evolution du nombre de cellules de *R. violacea* cultivées dans le milieu Provasoli supplémenté de 35 mg/l, 70 mg/l ou de 210 mg/l NaNO_3

Nous remarquons que la carence en azote n'affecte pas ou très peu la phase de latence dont la durée dépend principalement de l'état physiologique de l'inoculum. La phase exponentielle est affectée dans sa durée et dans sa pente ainsi que la concentration cellulaire en fin de période considérée. En effet, le milieu pauvre en azote (35 mg/ml) présente une concentration cellulaire après 2 semaines de culture, inférieure à celle obtenue dans les deux autres milieux. Cette différence est d'environ 30% comparée à celle obtenue dans le milieu 3 fois plus riche en azote (tableau 4). La pente la plus faible de la phase exponentielle est obtenue en condition de carence azotée (35 mg/ml). Dans les deux autres conditions, les pentes des phases exponentielles sont légèrement différentes. La phase stationnaire est plus rapidement atteinte dans le cas de culture faiblement enrichie en azote.

Tableau 4 : Influence de la concentration initiale en azote sur le temps de doublement et sur la concentration finale cellulaire

<i>Concentration initiale d'azote (NaNO₃)</i>	<i>Temps de génération en heure</i>	<i>Concentration cellulaire en fin de culture</i>
35 mg/l	39	1,15.10 ⁶ cell./ml
70 mg/l	29	2.10 ⁶ cell./ml
210 mg/l	26	3.10 ⁶ cell./ml

C - Influence de la température sur la croissance de *R. violacea*

La température est un des facteurs écophysiologiques qu'il faut maîtriser pour la culture des microalgues en laboratoire. La température optimale de culture ne dépend pas uniquement de l'espèce cultivée mais elle peut être aussi influencé par le climat de son habitat naturel. En effet, *Rhodella violacea* est rencontrée dans des habitats géographiquement très éloignés et très différents sur le plan climatique. Ainsi l'algue de Kornmann (1965) provient de l'île de Sylt, au nord de l'Allemagne ; une autre souche de *Rhodella violacea* a été isolée par Fresnel et Billard (1987) sur la plage de Temara, dans la région de Rabat au Maroc.

Pour déterminer la température optimale de croissance de *Rhodella violacea*, nous avons choisi d'étudier son développement dans trois conditions de température, 10°C, 20°C et 30°C. Les autres paramètres tels que la photopériode 16/8 jour/nuit, l'intensité lumineuse 150 $\mu\text{mole photon.cm}^{-2}.\text{S}^{-1}$ et l'agitation sont identiques pour les trois conditions de culture.

La première observation faite à l'issue de la culture de *R. violacea* est que le profil de sa courbe de croissance en milieu non renouvelé est proche de celui obtenu chez d'autres microorganismes. On observe l'existence de différentes phases de croissance (figure 15) :

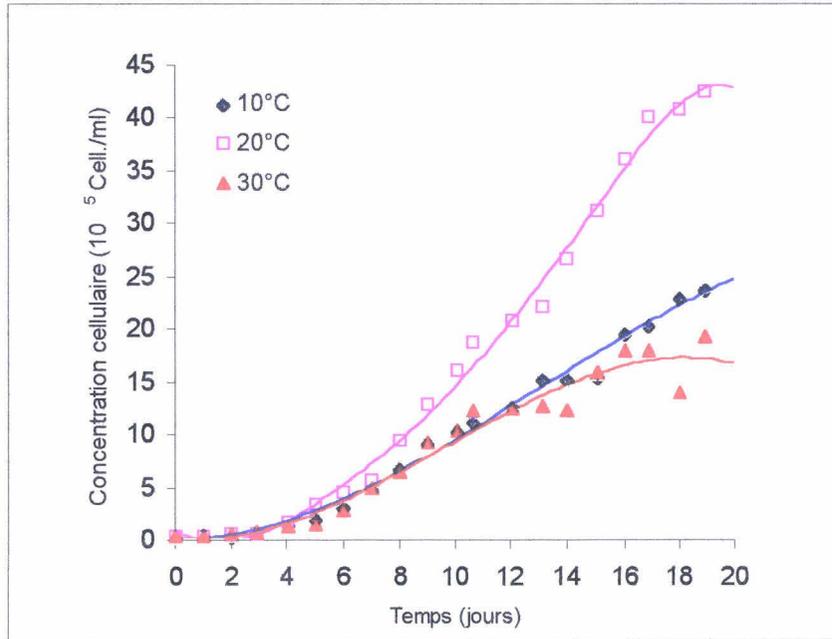


Figure 15 : Courbes de croissance de *R. violacea* à 10, 20 et 30°C (représentation dans l'échelle non logarithmique)

- la phase de latence qui correspond au temps d'adaptation des microorganismes au milieu neuf ; la durée de cette phase dépend entre autres de l'état physiologique des cellules et de la concentration cellulaire initiale ;
- la phase d'accélération durant laquelle la masse cellulaire commence à augmenter ;
- la phase exponentielle pendant laquelle le taux de croissance demeure constant et maximal ;
- la phase de ralentissement ;
- la phase stationnaire durant laquelle le bilan global de la biomasse est constant ;
- la phase de déclin ; en réalité cette phase n'est observable dans les cultures de *R. violacea* qu'à partir d'un temps de culture relativement long car ces microalgues développent une résistance aux phénomènes de lyse en se confinant dans un mucilage polysaccharidique qui protège les cellules contre les variations de pression osmotique des milieux de cultures.

Les tracés en coordonnées semi logarithmiques des différentes croissances (figure 16) nous permettent de calculer les temps de doublement cellulaire pour chaque condition de température (tableau 5).

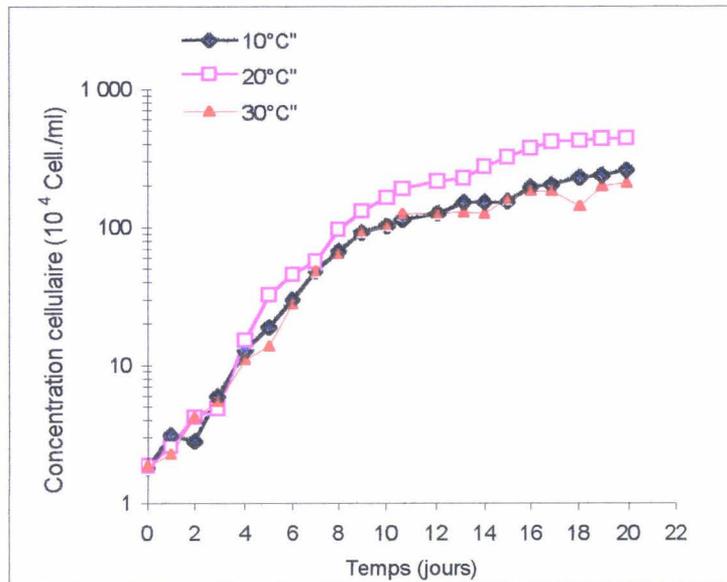


Figure 16 : Courbes de croissance de *R. violacea* cultivée à des températures de 10, 20, et 30°C (représentation en coordonnées semi-logarithmiques)

Ces résultats nous montrent que la température optimale de croissance de *R. violacea* est 20°C. En effet, à cette température on a le temps de doublement le plus faible et la concentration cellulaire la plus forte à l'issue de 3 semaines de culture (tableau 5).

Température de culture (°C)	Temps de doublement (heures)	Nombre de cellules en fin de culture (10^6 cellules / ml)
10	32	2,57
20	28	4,23
30	31	2,02

Tableau 5 : Temps de doublement en phase exponentielle de croissance et concentration cellulaire finale pour les trois conditions de températures utilisées (10, 20 et 30°C)

Le temps de doublement de *R. violacea* à 10°C est comparable à celui observé à 30°C (32 et 31 heures respectivement). La différence réside dans la quantité de cellules obtenue en fin des deux cultures : $2,57 \times 10^6$ cellules/ml pour 10°C et $2,02 \times 10^6$ cellules/ml pour la culture à 30°C. Nous avons constaté que les cellules cultivées à 30°C sont plus volumineuses et assez fragiles.

D - Effet de la température sur la physiologie de *R. violacea*

L'efficacité photosynthétique des algues comme celle des plantes supérieures est diminuée quand elles sont soumises à un stress lumineux dont l'intensité excède leur capacité de transformation de l'énergie électromagnétique en énergie chimique. Ce stress qui provoque le phénomène de photoinhibition, a été découvert par Ewart (1896). On sait à présent qu'il consiste en des destructions affectant préférentiellement le PSII. En effet, le polypeptide D1 constitutif du centre photochimique du PSII (figure 10 page 19) est endommagé (Barber et Andersson, 1992). Si ce stress augmente en durée ou en intensité, le polypeptide D2 peut également être affecté. Le mécanisme de la photoinhibition résulterait d'un flux très rapide des électrons de la phéophytine vers QA (accepteur primaire d'électrons dans le PSII, lié à la protéine D2). QA peut alors être réduit au-delà de son niveau normal QAH (un électron) et atteint le niveau QAH₂ (deux électrons). Cet état pourrait temporairement bloquer le transfert d'électrons du centre réactionnel à QA, et un état triplet P680-ch* serait engendré. L'état triplet P680-Ch* dans des conditions aérobies, pourrait réagir avec l'oxygène moléculaire et générer un oxygène singulet. Cette espèce d'oxygène est extrêmement active et peut détruire le P680 et dégrader le polypeptide D1.

Dans une certaine limite, les dégâts générés par les stress lumineux ne sont pas permanents, car les chloroplastes sont capables de régénérer la plupart des composants endommagés. En effet, après la levée du stress lumineux, la photoinhibition s'arrête et le rendement photosynthétique initial peut être restauré après un certain temps pendant lequel les cellules sont soumises à des intensités de lumière modérées.

Quelques organismes végétaux ont développé des mécanismes de protection contre les stress lumineux. Le mouvement des chloroplastes dans la cellule permet de modifier

l'orientation de thylacoïdes vis-à-vis de la lumière réduisant ainsi l'efficacité de capture de photons (Harris et Piccinin, 1987 ; Henley et coll.,1991 ; Kiefer, 1987). Un système de transition d'états (état I – état II) permettant une redistribution d'énergie absorbée entre le PSII et le PSI, a été décrit chez *R. violacea* par Delphin et collaborateurs (1996). L'accroissement de la dissipation thermique de l'énergie excitatrice au niveau du photosystème II est décrit par Krausse et Behrend (1986).

Le mécanisme photoprotecteur le plus connu et le plus étudié est celui du cycle des xanthophylles qui est mis en œuvre par les végétaux supérieurs et certaines algues. Ce mécanisme consiste en la dé-époxydation par la violaxanthine dé-époxydase de la violaxanthine pour produire de l'anthéroxanthine, puis la zéaxanthine (Andrew, 1991 ; Yamamoto et coll., 1962). Ce mécanisme protecteur est déclenché entre autres par le stress lumineux (figure 17).

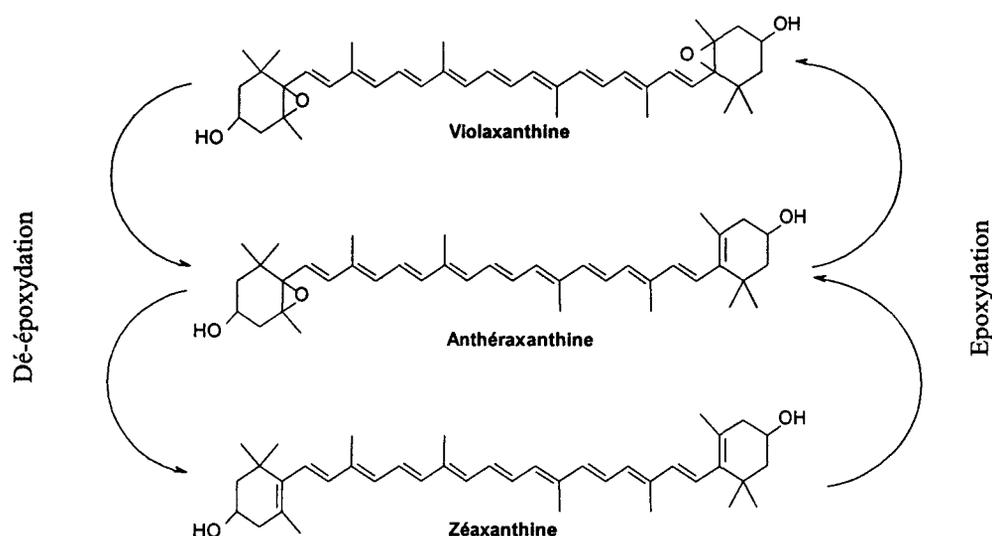


Figure 17 : Réactions constituant le cycle des xanthophylles. Les deux étapes de dé-époxydation sont assurées par une seule enzyme ; de même une seule enzyme assure les deux réactions d'époxydation

La composition pigmentaire de *R. violacea* est dépourvue de violaxanthine et d'anthéroxanthine. La protection par le cycle des xanthophylles contre un stress lumineux est donc exclue chez cette algue. L'ampleur de la photoinhibition ainsi que celle de la restauration, diffèrent selon les espèces ou bien au sein de la même espèce en fonction des facteurs environnementaux, la température étant l'un d'entre eux.

Pour suivre les variations d'ampleur de la photoinhibition et de la restauration chez *R. violacea*, on a mesuré la fluorescence chlorophyllienne et estimé les variations du rapport Fv/Fm qui est un bon indicateur de l'intégrité de l'appareil photosynthétique en particulier du PSII

Nous avons étudié la photoinhibition et la restauration chez les cellules de *Rhodella violacea* cultivées à trois températures différentes, 10, 20 et 30°C. Les valeurs initiales des rapports Fv/Fm au 6^{ème} jour de culture (temps T0 pour l'expérience du stress) des cellules cultivées à 10, 20 et 30°C sont respectivement 0,56, 0,67 et 0,64 ; excepté la première, les deux autres se situent entre la valeur 0,8 qui est observée en général chez les végétaux supérieurs et la valeur 0,6 observée chez *Spirulina platensis* (Vonshak et coll., 1994) et chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Falk et coll., 1990).

La figure 18 présente l'évaluation, au cour d'un stress et d'une période de restauration ultérieure, du rapport Fv/Fm, exprimé en % de la valeur initiale

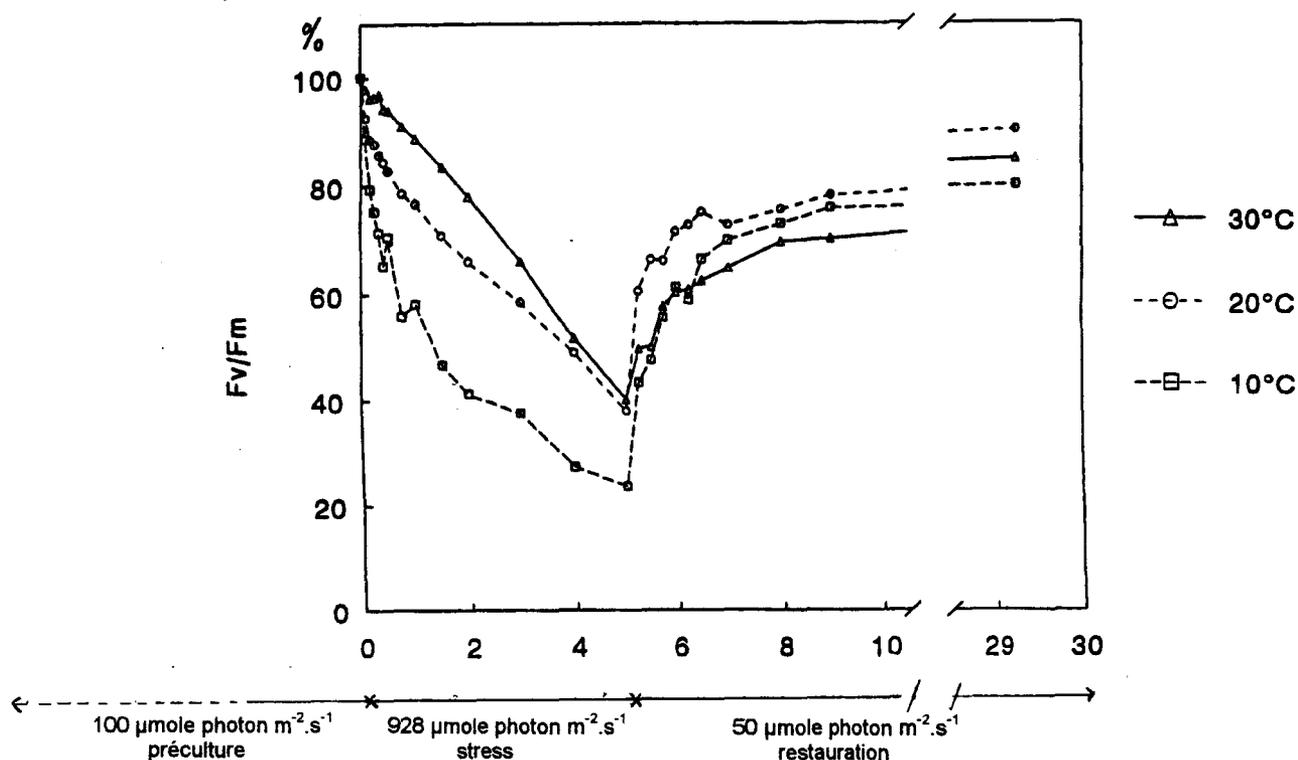


Figure 18 : Photoinhibition et restauration des cellules de *R. violacea* soumises à un stress lumineux (Fv/Fm exprimé en % de la valeur initiale de ce rapport qui est obtenue au 6^{ème} jour de culture des cellules dans les trois conditions de températures 10, 20 et 30°C)

En analysant les résultats résumés dans le tableau 6, à 5 min, 2 heures et 5 heures de stress et au bout de 24 heures de restauration, nous constatons :

- ⇒ à 10°C, une photoinhibition forte et rapide et une restauration rapide et d'ampleur moyenne ;
- ⇒ à 30°C, une photoinhibition plus lente et moins prononcée, la restauration est lente et faible ;
- ⇒ à 20°C, une photoinhibition un peu plus rapide qu'à 30°C, mais d'intensité comparable. Par contre, la restauration est beaucoup plus rapide et plus efficace à 20°C qu'à 30°C.

La température de culture joue donc un grand rôle dans le comportement physiologique des cellules de *R. violacea* vis-à-vis des variations d'un autre facteur environnemental tel que la lumière.

Tableau 6 : Ampleurs de la photoinhibition et de la restauration chez *R. violacea* cultivée à 10, 20 et 30°C, exprimées en % de la valeur initiale du rapport F_v/F_m

		Photoinhibition		
Intensité d'éclairement	Temps	10°C	20°C	30°C
	5 min	12%	8%	2%
982 $\mu\text{mole photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	2 heures	41%	34%	22%
	5 heures	76%	62%	60%
		Restauration		
50 $\mu\text{mole photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	24 heures	80%	90%	82%

Ces résultats montrent que les cellules cultivées à la température de 30°C sont les moins affectées par le stress lumineux car elles avaient probablement adapté leur système photosynthétique pour cette température qui est plus élevée par rapport à leur température optimale. Dans la nature, le stress lumineux et l'élévation de la température vont de paire, ce qui laisse à penser que les mécanismes d'adaptation vis à vis de ces deux stress doivent être indissociables.

On constate que les cellules cultivées à 10°C sont les plus sensibles à ce type de stress, et celles cultivées à 20°C (température optimale de culture) possèdent un maximum de restauration.

E - Thermosensibilité de l'appareil photosynthétique chez *R. violacea*

1 - Evolution de la fluorescence F0 en fonction d'un gradient de température

Les algues sont capables de s'adapter à des conditions de température différentes de celles de leur habitat naturel. Les membranes des thylacoïdes qui sont le siège des mécanismes photochimiques, sont le siège privilégié de cette adaptation. Chez les algues rouges, les phycobilisomes qui participent à ces mécanismes sont situés à la surface des thylacoïdes et constituent donc une antenne extrinsèque.

Nous allons exploiter les propriétés de fluorescence de la chlorophylle pour étudier la sensibilité de l'appareil photosynthétique vis-à-vis de la température. En effet, nous mesurons en continu la fluorescence F0 émise par des cellules chauffées dans une cuve à effet Peltier avec un gradient continu de température à 3°C/min de 20°C à 65°C. La valeur de F0 augmente quand le système photosynthétique est perturbé. Ainsi, l'augmentation de la température cause une désagrégation des composants photosynthétiques au sein de la membrane thylacoïdale ; la chlorophylle se met donc à réémettre la lumière sous forme de fluorescence.

La courbe obtenue figure 19 représente la fluorescence en fonction de la température appelée courbe de fluorescence-température (Schreiber et Berry, 1977 ; Schreiber et Armond, 1978). Au delà de la température optimale de l'algue, l'augmentation de la température engendre l'augmentation de la fluorescence F0. On voit apparaître deux épaulements, le premier atteint son maximum vers 50°C et le deuxième vers 60°C.

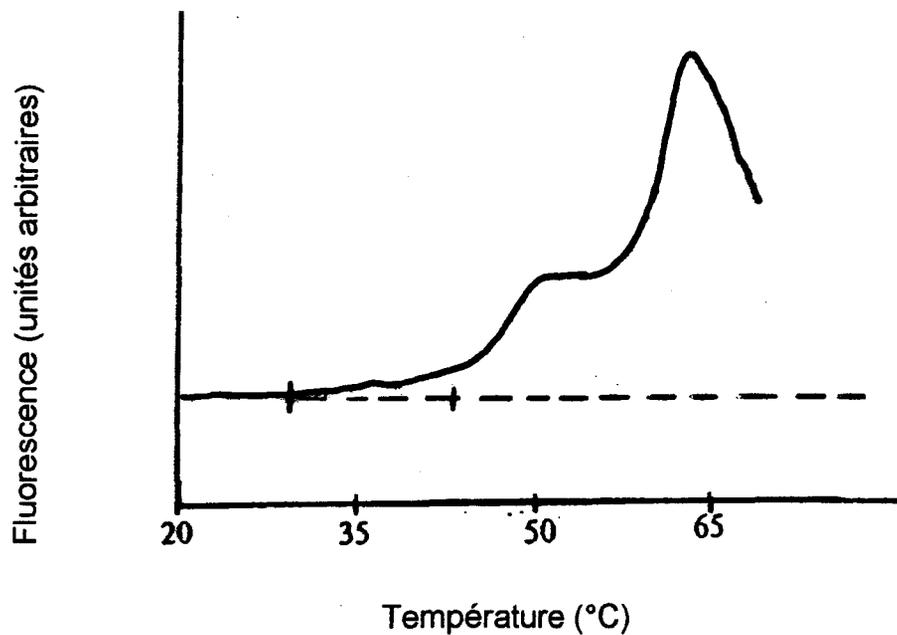


Figure 19 : Courbe de fluorescence-température obtenue sur des cellules de *R. violacea* cultivées à 20°C,

Chez les plantes supérieures, un seul épaulement est observé à des températures de 45 à 50°C (Ducruet et Lemoine, 1985 ; Havaux et Gruszecki, 1993 ; Havaux et Tardy, 1996) qui correspondrait au deuxième épaulement observé chez *R. violacea*. Ilik et collaborateurs (1995) ont fait état de deux épaulements faiblement prononcés chez la feuille d'orge, alors que Briantais et collaborateurs (1996) n'ont fait état que d'un seul épaulement chez la même plante. L'explication avancée à l'égard de l'épaulement observé chez les plantes supérieures serait la dissociation entre le complexe LHCII (Light Harvesting Complex) et le centre réactionnel du PSII (Armond et Coll., 1978 ; Berry et Björkman, 1980 ; Yamane et coll., 1997). De ce fait, l'énergie collectée par l'antenne n'est plus transférée vers le P680 ; elle est donc dissipée globalement sous forme de photons qui seront réémis par la chlorophylle sous forme de fluorescence (Bukhov et coll., 1990 ; Yamane et coll., 1995).

2 - Rôle des phycobiliprotéines dans l'évolution de la fluorescence

F0 induite par la température

Nous avons effectué l'expérience de mesure de la fluorescence induite par la température sur des cellules issues de deux cultures de *R. violacea* à 20°C. L'une de ces cultures est effectuée dans un milieu sans azote ajouté ; après 20 jours de culture, les cellules deviennent vertes (voir figure 13 p. 27) et quasiment dépourvues de l'antenne extrinsèque constituée par les phycobiliprotéines qui représentent habituellement plus de 60% du contenu protéique cellulaire chez les algues rouges (Bororad, 1975).

Dans le profil fluorescence-température issu de l'expérience sur les cellules très pauvres en phycobiliprotéines, nous constatons une disparition presque complète du premier épaulement lorsqu'on le compare au profil issu de l'expérience sur des cellules normalement riches en phycobiliprotéines (figure 20).

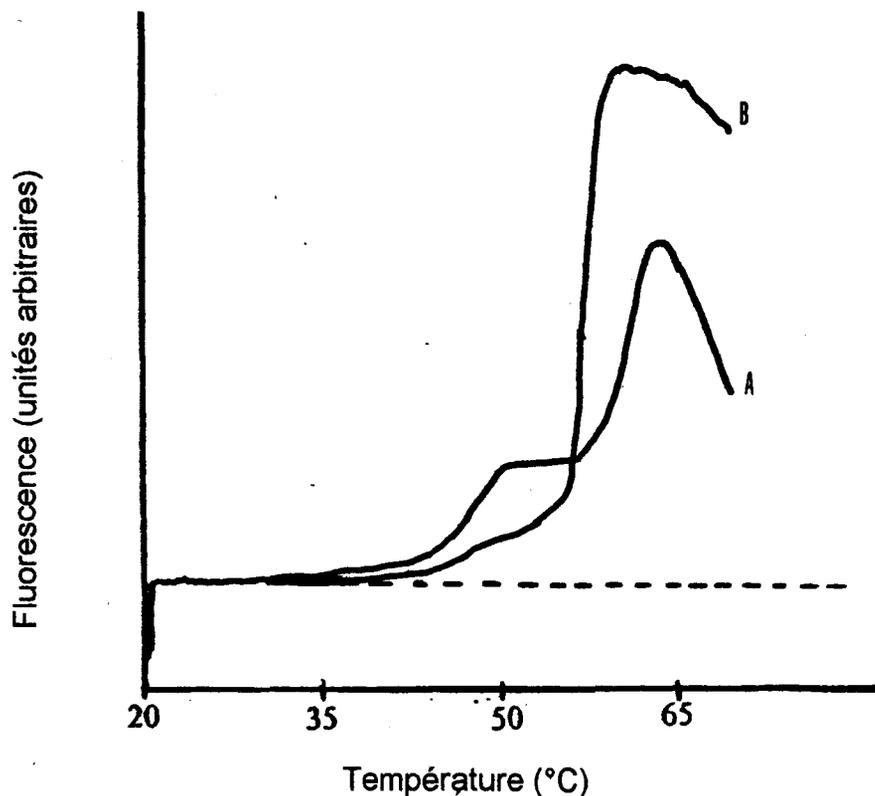


Figure 20 : Courbes fluorescence-température chez les cellules de *R. violacea* cultivées dans un milieu avec azote (A) et sans azote (B).

Nous pouvons donc attribuer le premier épaulement aux phycobiliprotéines. Une dissociation du phycobilisome du PSII provoquerait l'augmentation du F0. Cette

fluorescence induite peut provenir d'une réabsorption par la chlorophylle ou de la fluorescence émise par les phycobilines déconnectées.

Le deuxième épaulement est probablement dû à l'augmentation de la fluorescence de la chlorophylle, à la suite d'une hyperfluidisation de la membrane thylacoïdale à des températures de 55 à 65°C, et une dissociation physique de tous les composants du système photosynthétique.

3 - Influence de la température de culture sur la thermosensibilité de l'appareil photosynthétique

Comme nous l'avons vu plus haut, le comportement des cellules vis-à-vis d'un stress lumineux est variable selon la température de culture des algues. Les stress lumineux et les températures élevées affectent tous les deux l'intégrité de l'appareil photosynthétique (Havaux et Tardy, 1995). Pour mettre en évidence les variations de la thermosensibilité de l'appareil photosynthétique chez les algues cultivées dans trois conditions de température (10, 20 et 30°C), nous avons défini cinq températures critiques, T1, T2, T3, T4 et T5 selon la méthode de Havaux et Gruszecki (1993), sur la courbe fluorescence-température, comme indiqué dans la figure 21.

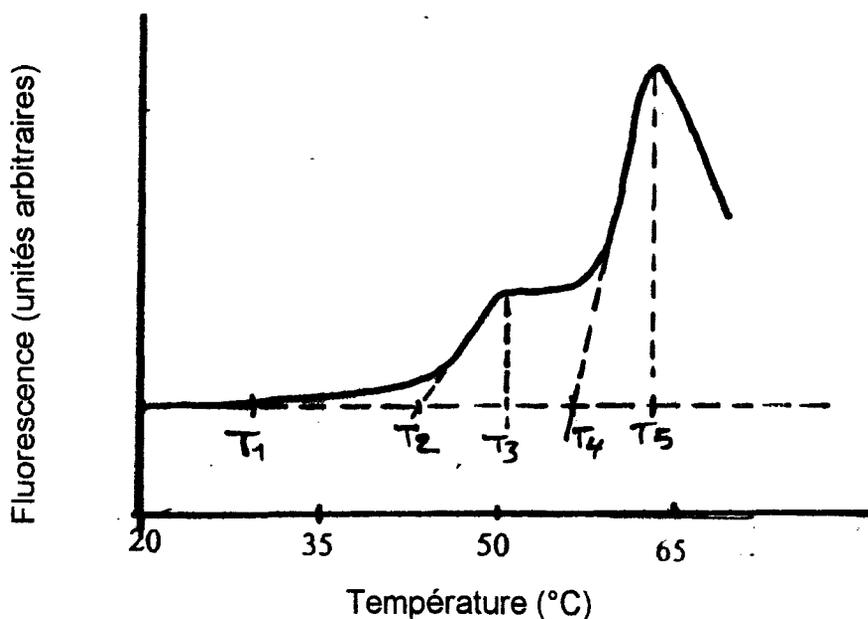


Figure 21 : Illustration des températures critiques (T1, T2, T3, T4, T5) sur un enregistrement fluorescence-température, selon Havaux et Gruszecki (1993)

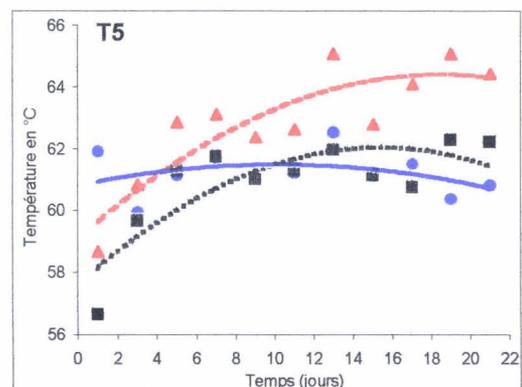
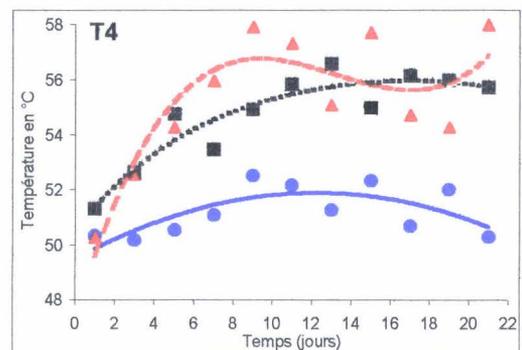
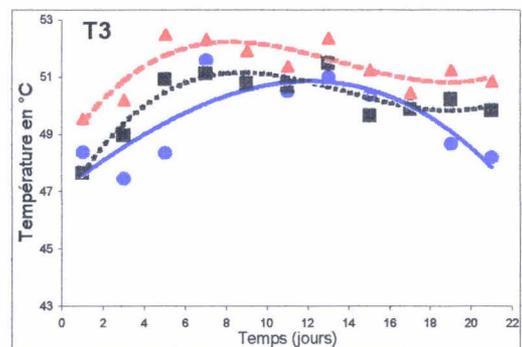
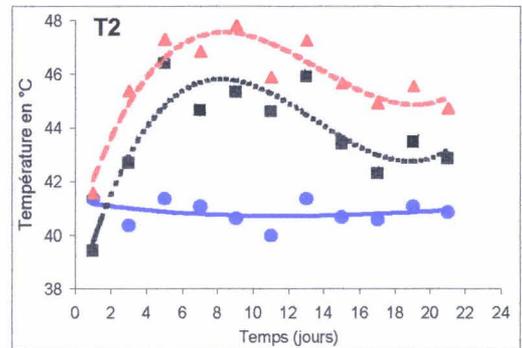
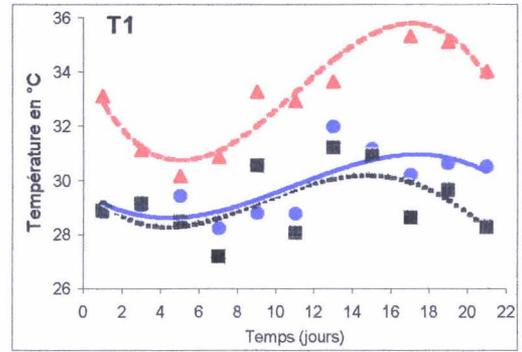
- T1** : Température qui induit le début de l'augmentation de F_0 ; elle correspond à un début de désorganisation des complexes photosynthétiques.
- T2** : Température induisant la première augmentation exponentielle du F_0 ; elle correspondrait au détachement des phycobilisomes des membranes des thylacoïdes.
- T3** : Température du premier plateau de F_0 ; elle correspond à la libération complète des phycobilisomes du complexe photosynthétique.
- T4** : Température qui induit la deuxième augmentation exponentielle du F_0 ; elle correspond au début de l'hyperfluidisation des membranes des thylacoïdes.
- T5** : Température du deuxième maximum de fluorescence ; au delà de cette température, on a une destruction moléculaire des chlorophylles.

Nous avons suivi l'évolution de ces températures durant trois semaines de culture. Les résultats des variations de T1, T2, T3, T4 et T5 pour les trois conditions de températures sont présentés dans la figure 22 ; l'analyse de ces résultats montre quatre aspects principaux :

- 1 – les températures critiques de T1 à T5 des cellules cultivées à 30°C sont supérieures à celles des cellules cultivées à 20 et 10°C ; cela montre que les algues se sont adaptées à la température de 30°C et que cette adaptation concerne tout particulièrement les complexes pigmentaires ;
- 2 – les températures critiques dépendent de l'état physiologique des cellules. Elles varient au cours de la croissance des cellules cultivées à une température donnée. Globalement, les températures critiques les plus fortes sont observées au cours de la phase exponentielle de croissance ;
- 3 – les profils de l'évolution des températures critiques en fonction du temps sont comparables pour les cultures à 20 et 30°C ;
- 4 – à l'exception de T1 et T3, les températures critiques restent relativement stables durant toute la durée de la culture à 10°C .

Figure 22 : Evolution des températures critiques T1; T2, T3, T4, T5, pour les trois conditions de températures de cultures 10, 20 et 30°C

10°C —●— 20°C —■— 30°C —▲—



Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure que *R. violacea* adapte son appareil photosynthétique à la température de culture, et que cette adaptation est très probablement, en partie, de type conformationnel. Le phycobilisome participe aussi à cette adaptation. Il est bien connu que l'adaptation aux températures de culture est accompagnée généralement par une modification de la composition en acides gras des lipides membranaires. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la composition globale en acide gras des membranes.

F - Effet de la température de culture sur la composition en acides gras chez *R. violacea*

La fluidité des membranes thylacoïdales joue un rôle essentiel dans les mécanismes photosynthétiques, qui nécessitent une certaine mobilité de leurs composants. En effet, chez les végétaux supérieurs, le complexe LHCII faisant partie des unités photosynthétiques et en étroite relation avec le PSII, est une entité mobile. La violaxanthine se détache du LHCII par l'effet de la température et va se dissoudre dans les lipides des membranes thylacoïdales (Havaux et Tardy, 1996). De même, sous l'effet d'un stress lumineux, la violaxanthine, l'anthéroxanthine et la zéaxanthine s'éloignent du PSII pour aller se dissoudre dans les lipides de la membrane thylacoïdale (Havaux et Tardy, 1995).

La structure des acides gras est à la base de la fluidité membranaire. Leurs degrés d'insaturation et la longueur de leur chaîne carbonée déterminent les caractéristiques physiques des membranes. Pour l'adaptation aux températures extrêmes, les cellules sont capables de modifier la structure des acides gras pour maintenir leurs lipides membranaires dans un état de fluidité favorable au bon fonctionnement des mécanismes physiologiques, en l'occurrence la photosynthèse (Mendoza et Coll., 1996).

Nous avons suivi la composition en acides gras des lipides membranaires chez *R. violacea* cultivée à 10, 20, et 30°C. Les analyses ont été effectuées dans trois phases de croissance : la phase de latence, la phase exponentielle et la phase stationnaire.

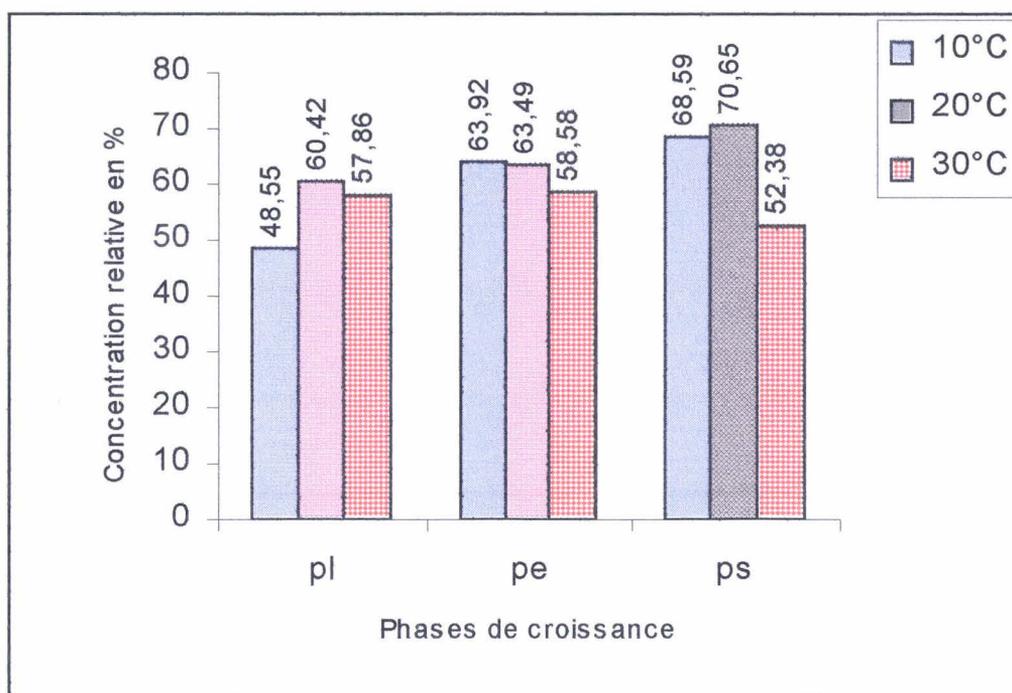


Figure 23 : Teneurs en acides gras membranaires insaturés dans les trois phases de croissance (pl = phase de latence, pe = phase exponentielle, ps = phase stationnaire) pour les trois températures de culture 10, 20 et 30°C.

Les teneurs en acides gras insaturés (figure 23) varient de 49 à 71% selon la phase de croissance et la température de culture de *R. violacea*. Si l'on compare ces teneurs entre la phase de latence et la phase stationnaire pour les températures 10°C et 30°C, nous constatons une augmentation de 49% à 69% pour 10°C, et une diminution de 58% à 52% pour 30°C. Ces variations permettent l'augmentation de la fluidité membranaire des algues cultivées à faible température (10°C), et sa diminution chez les algues cultivées à une température plus élevée (30°C). La modification de la composition en acide gras insaturés membranaires permet à *R. violacea* l'adaptation aux conditions de température auxquelles elle est soumise.

En ce qui concerne la composition globale de lipides membranaire en acides gras (tableau 7), on remarque la prédominance de l'acide palmitique $C16:0$ dans les trois phases de croissance pour les trois conditions de température ; l'acide arachidonique $C20:4\omega6$ et l'acide éicosapentanoïque (EPA) $C20:5\omega3$ sont prédominants dans les deux phases exponentielle et stationnaire, pour les trois températures de culture.

Pour la phase de latence dans les trois conditions de température, les teneurs en C20:4 et C20:5 sont comparables aux teneurs en C16:1, en C18:1 (acide oléique) et en C18:0 (acide stéarique), ce dernier est abondant dans en phase de latence dans les trois conditions.

On constate une diminution de la teneur en C22:6 ω 3 (acide docosahexanéique) qui est de 9 à 12% en phase stationnaire et qui chute à une teneur de 0,9 à 2,06 dans les phases exponentielle et stationnaire pour les trois conditions. L'EPA se trouve sous forme d'ester de monogalactosyl diglycéride (MGDG), de phosphatidyl éthanolamine (PE) et de phosphatidylcholine (PC) chez *Navicula saprophila* (Kitano et coll., 1998). Chez *Porphyra tenera* il est distribué entre le MGDG, le digalactosyl diacylglycéride (DGDG) et le 6-sulfoquinovosyl diacylglycéride (SQDG) (Nisizawa et coll., 1987). Chez *Porphyridium cruentum*, la plupart des acides gras insaturés se trouvent conjugués au MGDG (Shiran et coll., 1996).

Tableau 7 : Proportions relatives des acides gras au cours des trois phases de croissance (PL= phase de latence, PE= phase exponentielle, PS= phase stationnaire) et dans les trois conditions de température de culture (10°C, 20°C et 30°C)

	Températures de culture								
	10°C			20°C			30°C		
	Phases de croissance								
	PL	PE	PS	PL	PE	PS	PL	PE	PS
C14:0	2,02	0,75	0,56	2,59	0,56	0,53	3,18	0,97	0,70
C16:0	30,53	29,28	27,01	24,42	30,96	26,79	22,08	34,34	36,52
C16:1	6,22	7,55	5,89	11,33	6,79	6,54	11,19	9,59	8,21
C18:0	11,85	4,00	2,18	9,57	4,11	1,85	12,17	5,02	9,18
C18:1	8,03	8,51	4,89	13,43	5,90	5,98	11,87	9,16	7,17
C18:2	1,55	2,67	0,48	3,02	2,57	1,20	1,76	2,40	5,23
C18:3	3,98	0,94	0,99	4,86	1,01	0,36	2,24	1,42	0,89
C20:0	0,87	0,21	0,15	0,30	0,12	0,11	0,31	0,28	0,11
C20:2	2,06	1,55	1,55	2,64	1,79	2,08	2,59	1,34	2,67
C20:3 ω 6	0,63	2,30	1,87	0,73	0,86	0,59	0,78	0,85	0,53
C20:4 ω 6	5,09	9,91	18,12	7,42	17,63	22,09	7,25	12,44	14,11
C22:1 ω 9	0,84	0,67	0,36	0,51	0,35	0,27	0,72	0,32	0,20
C20:5 ω 3	10,79	27,76	32,72	7,23	25,69	29,67	6,91	19,34	12,45
Nd	5,34	1,56	1,25	2,43	0,49	0,38	4,17	0,64	0,39
C24:0	0,83	0,29	0,24	0,28	0,25	0,30	0,22	0,16	0,72
C22:6 ω 3	9,37	2,06	1,72	9,25	0,91	1,27	12,55	1,72	0,94

Dans la figure 24 sont présentées les évolutions des teneurs en acides gras saturés et insaturés, déterminées pendant les trois phases de croissance des cellules de *R. violacea* cultivées à 10, 20 et 30°C.

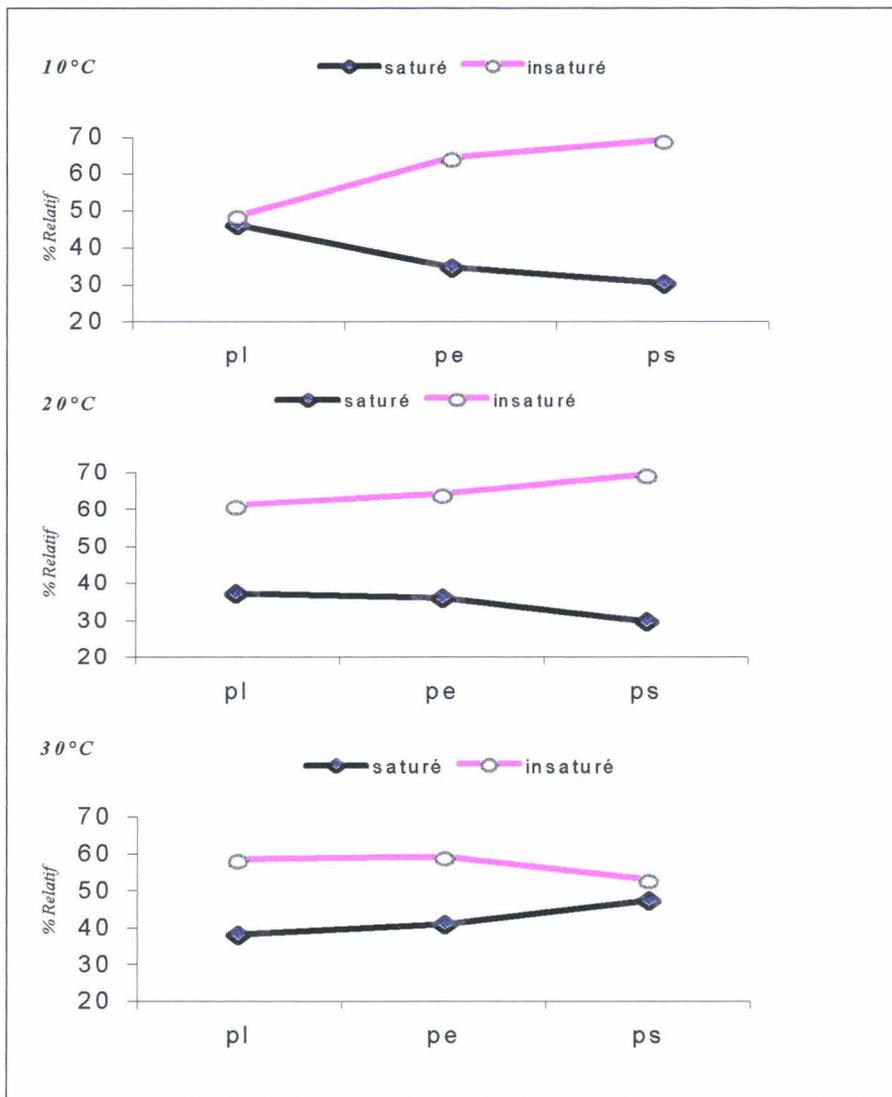


Figure 24 : Composition en acides gras saturés et insaturés des cellules de *R. violacea* cultivées à 10, 20 et 30°C, valeurs estimées au cours des phases de croissance : (pl = phase de latence, pe = phase exponentielle, ps = phase stationnaire)

A 10°C, on a une augmentation des acides gras insaturés et une diminution des acides gras saturés.

A 20 °C, on a une légère variation qualitative des acides gras.

A 30°C, on a le phénomène opposé à celui observé dans les cultures à 10°C : une diminution de la proportion en acides gras insaturés compensée par une augmentation équivalente des acides gras saturés.

Ces résultats confirment que pour s'acclimater, *R. violacea* met en œuvre une régulation de la fluidité des membranes grâce à la variation des rapports entre les teneurs en acides gras saturés et insaturés. Il est connu que la température basse favorise la synthèse des acides gras polyinsaturés (Becker, 1994).

Parmi les acides gras polyinsaturés rencontrés chez *R. violacea*, on en trouve deux particulièrement intéressants : l'acide éicosapentanoïque (EPA) $C_{20:5\omega3}$ et l'acide arachidonique $C_{20:4\omega6}$ qui sont deux acides gras essentiels précurseurs des prostaglandines et d'autres éicosanoïdes (Deby, 1988). L'acide éicosapentanoïque possède des activités biologiques telles que la réduction du taux de cholestérol sanguin et la prévention de l'artériosclérose. L'intérêt pharmaceutique de ces acides gras polyinsaturés est en pleine progression. Plusieurs espèces de microalgues en produisent (Ohta et coll., 1993 ; Molina et coll., 1996 ; Kawachi et coll., 1996). Chez *R. violacea*, ils représentent la majorité des acides gras (tableau 7). Leur production à partir des algues et leur commercialisation est en compétition avec la production de ces acides gras à partir des graisses de poissons. Les acides gras polyinsaturés issus des algues sont très peu contaminés par d'autres acides gras instables, ce qui leur donne un avantage sur les acides gras polyinsaturés d'origine animale. De plus, l'apport de ces acides gras polyinsaturés par les microalgues est essentiel pour la pisciculture.

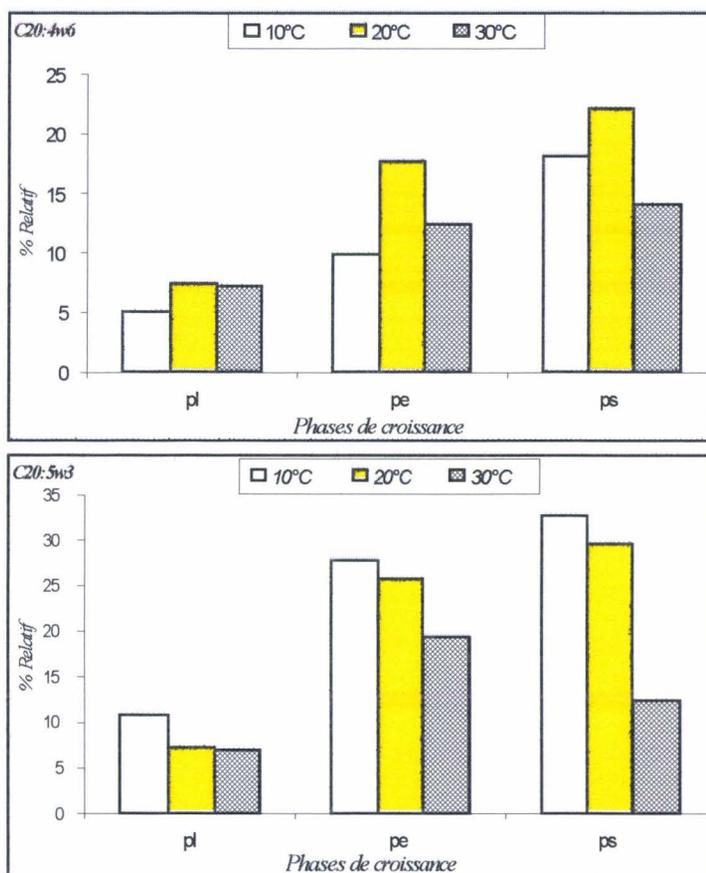


Figure 25 : Evolution de la teneur en acides gras : le C20:4ω6 acide arachidonique et le C20 : 5ω3 acide eicosapentaenoïque (EPA)

Les conditions de température 10 et 20°C sont plus favorables à la production des deux acides gras C20:4 et C20:5, par rapport à la température de 30°C (figure 25). Chez le *Porphyridium cruentum* cultivé à 20°C, le pourcentage d'EPA peut dépasser les 30% dans une culture semicontinue (Otero et coll., 1997). Chez une espèce phytoplanctonique PP301 cultivée à 25°C, lorsqu'elle est cultivée à 15, 25 ou 35°C les pourcentages de l'EPA sont respectivement de 48,5%, 54,5% et 44,9%, (Kawachi et coll., 1996). Chez certaines macroalgues récoltées en mer telles que *Undaria pinnatifida*, *Sargassum muticum*, *Himanthalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, on trouve des faibles pourcentages en EPA, qui représentent chez ces espèces, respectivement 2,9, 2,5, 3,6, et 3,6%, des acides gras totaux alors que l'acide arachidonique est majoritaire et présente des pourcentages respectifs de 19,2, 19,4, 31,8 et 23,9% dans ces algues (Herbreteau et coll., 1997)

IV - CONCLUSION

La réponse des cellules *R. violacea* aux variations des conditions de culture se traduit par un épuisement de l'azote dans leur réserve protéique lorsqu'elles subissent une carence azotée. Cela provoque le verdissement cellulaire et une baisse de croissance cellulaire. Les températures non optimales provoquent chez cette algue une variation dans la composition en acides gras membranaires, ce qui lui permet de s'adapter à ces températures. Une adaptation à une température supérieure à 20°C (température optimale de culture) engendre une meilleure résistance au phénomène de stress lumineux, alors qu'une adaptation à une température inférieure à 20°C diminue la capacité des cellules à résister à ce types de stress.

CHAPITRE II

LES EXOPOLYSACCHARIDES

CHEZ *RHODELLA VIOLACEA*

I - INTRODUCTION

Les algues rouges unicellulaires sont les organismes les moins complexes de la division des Rhodophyta ; elles font partie de la sous classe des Bangiophycidae et appartiennent à l'ordre des Porphyridiales. Les genres les plus connus sont le *Porphyridium*, le *Rhodella* et le *Rhodosorus*. Leurs cellules sont entourées d'une gaine mucilagineuse constituée de polymères polysaccharidiques. La partie externe de cette gaine se dissout dans le milieu de culture ; ainsi, pendant la phase stationnaire de croissance, l'accumulation de ces polymères rend le milieu de culture très visqueux. Le rôle de ces polymères n'est pas bien défini ; il est probable que cette capsule, en piégeant l'eau, procure un environnement humide aux cellules en cas de dessiccation (ce phénomène est observable sous microscope lors d'un dépôt sur lame, après évaporation d'eau à l'air libre : les cellules gardent un environnement humide grâce aux exopolysaccharides -EPS-). De plus, cette capsule, en formant un rempart, protégerait les cellules des diverses variations dans la composition du milieu, pH, salinité et agents microbiens susceptibles d'altérer la viabilité des cellules ; ceci leur permet de survivre dans des conditions environnementales extrêmes. Le rôle de ces polysaccharides dans la motilité des cellules est décrit chez *Porphyridium purpureum* : l'excrétion des polysaccharides de façon polaire permet aux cellules de se déplacer dans le sens opposé à cette sécrétion (figure 26) (Lin et Coll., 1975).

Ces polysaccharides se sont révélés intéressants grâce à leurs propriétés rhéologiques et physico-chimiques. En effet, à faible concentration en milieu aqueux, ils procurent de fortes viscosités. Ainsi leurs propriétés rhéologiques sont comparables à celles des xanthanes et des carraghénanes. Ils constitueraient donc une source importante et contrôlable qui alimenterait les industries utilisatrices des phycocolloïdes.

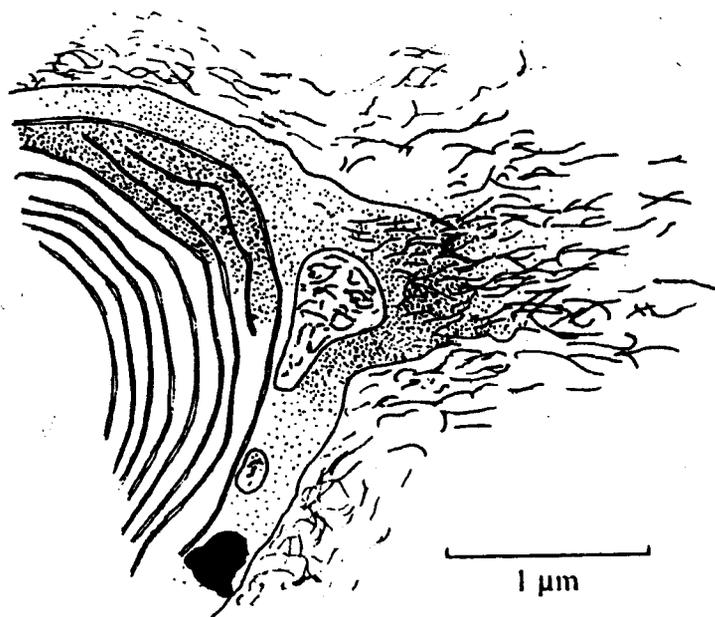


Figure 26 : Représentation schématique du déplacement de cellules de *P. cruentum* par sécrétion de mucilage polysaccharidique (Lin et coll., 1975)

La caractérisation des propriétés physico-chimiques de ces polysaccharides, dans le but de leur exploitation industrielle, est en progression continue. En effet, la firme Israélienne « Israël Chemicals Ltd » a testé les polysaccharides issus du *Porphyridium sp.*, et a trouvé que leurs propriétés épaississantes et stabilisantes peuvent être exploitées pour une application en industrie agroalimentaire (Gudin, 1987).

D'autres travaux de comparaison des propriétés rhéologiques des polysaccharides issus des microalgues rouges telles que *R. reticulata* et *P. aerugineum*, avec celles des xanthanes ou des carraghénanes, ont montré que la viscosité des solutions de polysaccharides issus des deux microalgues est bien supérieure à celle des xanthanes et des carraghénanes (Arad, 1987). Le mélange des polysaccharides issus de *Porphyridium sp.* ou de *Rhodella reticulata* avec d'autres polymères tels que la gomme de caroube, donne des gels possédant des propriétés rhéologiques intéressantes (Geresh et Arad, 1991). Ce phénomène est bien connu pour les mélanges d'autres polysaccharides tels que les xanthanes et les acides mannuroniques (Gudin, 1987).

Une équipe française de recherche du CEA de Cadarache a cultivé le *Porphyridium cruentum* dans des photobioréacteurs tubulaires pour la production contrôlée des polysaccharides (Chaumont et coll., 1987). En Israël, dans le désert de Néguev, est cultivé le *Porphyridium sp.* dans des pochettes de polyéthylène pour produire à la fois des polysaccharides et des phycobiliprotéines (Cohen et coll., 1991).

L'influence des paramètres environnementaux et celle de la composition du milieu de culture sur la croissance cellulaire, sur la production des polysaccharides et sur la qualité de ces polymères, sont assez bien documentées (Chaumont et coll., 1987 ; Arad, 1987 ; Arad et coll., 1992 ; Arad et coll., 1993 ; Geresh et Arad, 1991 ; Rotem et coll., 1992 ; Ucko et coll., 1994). La composition chimique de ces polysaccharides est largement étudiée chez le *Porphyridium* (Ramus, 1972, 1973, 1986 ; Kieras et coll., 1976a, 1976b, 1977 ; Medcalf et coll., 1976 ; Percival & Foyle, 1979). Quant à la composition chimique des polysaccharides issus de *Rhodella*, celle-ci fait l'objet d'études beaucoup plus restreintes (Callow et Evans, 1974 ; Fareed et coll., 1974 ; Jaseja et Perlin, 1989 ; Geresh et coll., 1990). C'est Evans et collaborateurs (1974) qui sont les premiers à étudier la synthèse et la composition du mucilage chez *Rhodella maculata*. Ils ont utilisé le sulfate radioactif pour montrer que la sulfatation des mucilages polysaccharidiques se fait dans la citerne golgienne avant d'être exportée via des vésicules jusqu'à la capsule, et être ensuite excrétée dans le milieu de culture. Ils ont montré aussi que les sulfates sont épuisés rapidement dans le milieu de culture pendant la phase éclairée. Ils trouvent que le mucilage contient 50% de polysaccharides dont le xylose et l'acide glucuronique qui sont les monosaccharides majoritaires, 16% de protéines et 10% de sulfates.

Kieras et Chapman (1976a) ont montré la présence d'acide aldobiuroniques (figure 27), suivant : le 3-O-(α -D-glucopyranosyluronic)-L-galactose (1), le 3-O-(2-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic)-D-galactose et le 3-O-(2-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic)-D-glucose dans les mucilages de *P. cruentum*. Percival et Foyle (1979) ont montré dans les polysaccharides de *P. cruentum* et de *P. aeruginum* la présence de l'acide glucuronique lié en α 1,3 au D-galactose et de l'acide 4-O-(2-O-méthylglucuronique)-L-galactose uniquement chez le *P. cruentum*. Dans le mucilage de *R. reticulata*, la présence de la molécule (1) a été montrée par Jaseja et Perlin (1989) et par Geresh et collaborateurs (1990). Lupescu et collaborateurs. (1992) ont montré la

présence de l'acide 3-O-(α -D-glucopyranosyluronique)-galactopyranose dans le mucilage de *Porphyridium sp.*

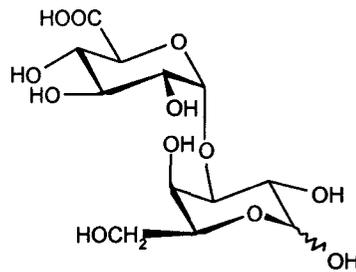


Figure 27 : Structures d'un acide aldobiuronique :
3-O-(α -D-glucopyranosyluronique)-L-galactose

Dubinsky et collaborateurs (1992) ont montré que le polysaccharide de *R. reticulata* est composé de xylose, 3-O-méthylpentose, glucose, galactose, rhamnose, ribose, arabinose, 4-O-méthylgalactose, mannose et d'acide glucuronique, ainsi que de traces de 2,4-diméthylhexose. Ils ont montré également que ce polysaccharide est constitué de deux types de polymères qu'ils ont séparés par chromatographie échangeuse d'ions, l'un riche en galactose et glucose, l'autre riche en xylose et acide glucuronique.

Chez *R. maculata*, Fareed et Percival (1974) ont montré la présence majoritaire du xylose, une teneur de 8 à 10% de sulfates et 16% de protéines. Ils concluent que ce polymère est un hétéropolysaccharide. En 1976, ces mêmes auteurs ont mis en évidence le rhamnose et le 3-O-méthylxylose dans les polysaccharides issus de mucilage de *R. maculata*.

Callow et Evans (1974) ont étudié le mucilage chez *Rhodella sp.*, ils ont montré qu'il est constitué de 50% de sucres, de 16% de protéines et de 10% de sulfates, et que les polysaccharides et les protéines ne sont pas liés d'une manière covalente. Par contre, cette liaison covalente entre les protéines et les polysaccharides a été mise en évidence chez *P. cruentum* par Kieras et collaborateurs. En 1977, dans les mêmes travaux, ils ont montré que la synthèse de ces polysaccharides et leur sulfatation, se font dans l'appareil de Golgi.

A notre connaissance, il n'y a aucun travail publié à ce jour concernant l'étude des polysaccharides chez *Rhodella violacea*. Dans ce travail, nous allons présenter la production de ces polysaccharides en fonction de la concentration en azote du milieu de culture, l'étude comparative de la composition monosaccharidique, du taux de sulfatation des deux polysaccharides produits par *R. violacea*, l'un capsulaire, l'autre soluble dans le milieu de culture. Nous étudierons également l'affinité des polysaccharides solubles aux ions bivalents métalliques.

II - MATERIEL ET METHODES

La culture de *R. violacea* en milieu non renouvelé est effectuée dans la solution EMA (annexe 1).

A - Extraction des polysaccharides solubles

Les polysaccharides solubles produits par une culture de *Rhodella violacea* âgée de 28 jours sont séparés des cellules par une centrifugation de 20 min. à 12400xg à 4°C. Le surnageant contenant les polysaccharides solubles est dialysé 48 heures contre l'eau distillée (le changement d'eau est effectué au moins 6 fois) puis séparé en deux volumes ; l'un est précipité par 3 volumes d'éthanol absolu, l'autre par 3% de CTAB (annexe 3)

B - Extraction des polysaccharides capsulaires

Le culot cellulaire est rincé 2 fois avec de l'eau de mer pour débarrasser les cellules des polysaccharides non capsulaires. Les polysaccharides capsulaires sont extraits selon la méthode d'Evans et collaborateurs (1974) qui consiste en une agitation des cellules en milieu aqueux à 40°C pendant 48h, et celle de Paulsen et Vieira (1994) qui consiste en la fixation des cellules par une solution de formaldéhyde à 5% pendant 2h, puis lavage par l'eau distillée avant de faire l'extraction à 55°C pendant 16h. Cette dernière méthode réduit la contamination des polysaccharides par les pigments hydrosolubles.

C - Analyse chimique des deux types de polysaccharides

1 - Dosages colorimétriques

Les lyophilisats de polysaccharides sont solubilisés dans de l'eau distillée. Les dosages des sucres totaux dans ces solutions sont effectués au phénol sulfurique selon la méthode de Dubois et collaborateurs (1956) (annexe 4). Les dosages des acides uroniques sont effectués au méta-hydroxydiphényl selon la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) (annexe 5).

2 - Dosage des sulfates par HPLC

La méthode de dosage des sulfates par HPLC a été développée par Mass et collaborateurs (1986). 1 à 2 mg de polysaccharides lyophilisés sont hydrolysés par une solution d'HCl 2N pendant 2 heures à 100°C ; l'acide chlorhydrique est éliminé par une série de coévaporations à 35°C avec de l'eau Ultra Haute Qualité (UHQ), à l'aide d'un évaporateur rotatif. La dernière évaporation est effectuée à sec, l'hydrolysat sec est repris par 0,5 à 1 ml d'eau (UHQ) et injecté en HPLC équipée d'une colonne échangeuse d'ions Wescan (ALLTECH). L'élution est effectuée avec le solvant hydrogénéphthalate de potassium 8 mM à pH 4,5 avec un débit 1ml/min. La détection se fait par conductimétrie, les sulfates sont identifiés par leur temps de rétention. Une gamme étalon de 0 à 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de SO_4^{2-} est réalisée à partir d'une solution mère de sulfate de potassium (K_2SO_4).

3 - Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Cette technique permet la détermination de la composition centésimale des monosaccharides constituant les polysaccharides. Nous avons utilisé deux méthodes pour la préparation des acétates d'alditols. Tout d'abord, la méthode de Slonecker (1972) (annexe 6) qui est constituée par trois étapes distinctes, l'hydrolyse des polysaccharides, la réduction des monosaccharides obtenus et ensuite leur acétylation pour l'obtention des acétates d'alditols (dérivés volatiles que l'on peut séparer en CPG). Cette méthode ne préserve pas un monosaccharide fréquemment rencontré dans les polysaccharides d'origine algale qui est le 3,6-Anhydrogalactose. Pour vérifier une éventuelle présence de ce monosaccharide dans nos polysaccharides, nous avons utilisé une autre méthode de préparation d'acétates d'alditols qui est la méthode de Stevenson et Furneaux (1991) (annexe 7) basée sur une double hydrolyse en présence d'un réducteur (4-méthyl-morpholinoeborane). L'hydrolyse et la réduction se font donc

en même temps ce qui permet la préservation du pont 3,6-anhydrogalactose avant l'étape d'acétylation.

D - Etude de l'affinité des métaux lourds aux polysaccharides

1 - Préparation des complexes ions polysaccharides

a - Transformation des fonctions carboxyliques sous forme

R-COO⁻ H⁺

Les polysaccharides sont dissous dans l'eau UHQ (0,5 mg/ml). A l'aide d'une spatule, on ajoute peu à peu, sous agitation, une résine Amberlite IR-120-P sous sa forme H⁺, jusqu'à stabiliser le pH à 3,2. La solution de polysaccharides est récupérée par filtration sur de la laine de verre ; tous les groupements carboxyliques des acides uroniques sont alors sous forme protonée.

b - Détermination du pKa des polysaccharides

Pour déterminer le pKa de la solution de polysaccharides dont les groupements carboxyliques sont sous forme protonée, nous avons effectué un titrage de cette solution par une solution basique de NaOH 10 mM. Le pKa est déterminé par le pH correspondant à la demi-neutralité sur la courbe de titrage.

c - Mise en contact des polysaccharides et des différents métaux

La solution de polysaccharides (0,5 mg/ml) est fractionnée en deux aliquots de 15 ml puis dialysée pendant 48 heures à 10°C contre des solutions de métaux à 0,2 M. Par diffusion à travers la membrane de dialyse, les métaux arrivent dans les solutions de polysaccharides (figure 28). Ensuite, on effectue une dialyse contre l'eau distillée pendant 72 heures à 10°C ; l'eau de dialyse est changée fréquemment ; on termine la dialyse dans l'eau UHQ. Le suivi de cette dialyse est effectué par un contrôle conductimétrique. Dans les mêmes conditions, on dialyse le même volume en eau UHQ contre les solutions des ions. Cela nous permet d'estimer les quantités d'ions qui restent dans les boudins après la seconde dialyse, servant ainsi de témoin blanc.

Nous avons dialysé une solution de polysaccharides contre l'eau pour servir de témoin blanc polysaccharidique.

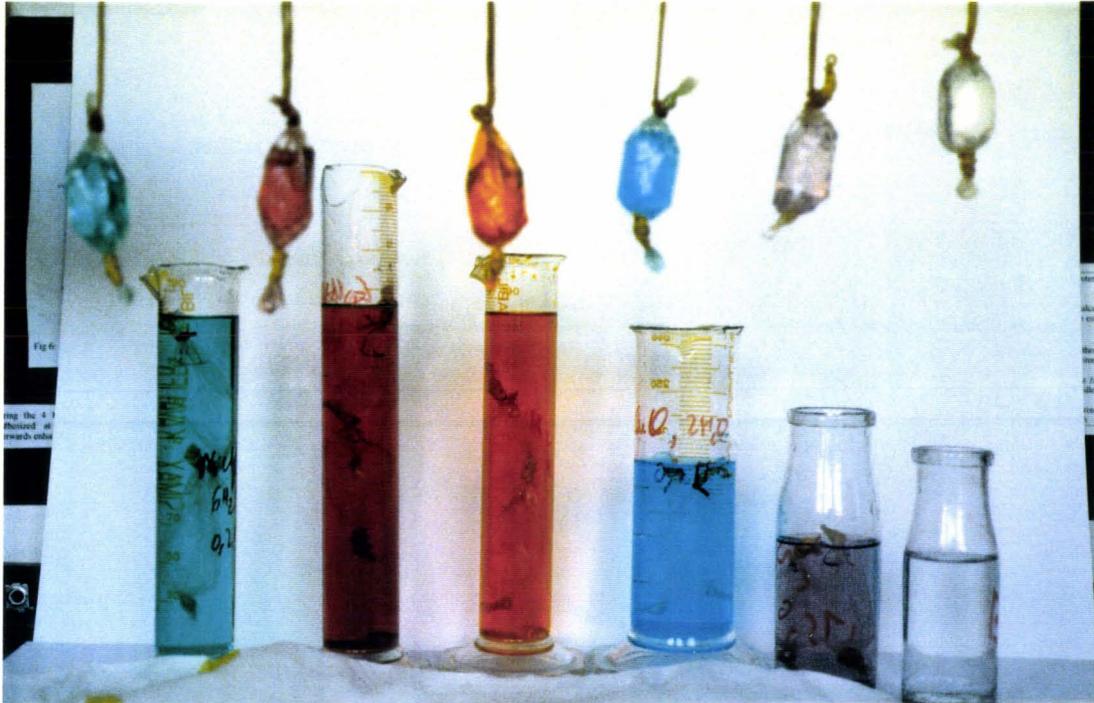


Figure 28 : Boudins remplis de solution de polysaccharides après dialyse de 48 heures contre des solutions 0,2 M (les ions sont passés des solutions ioniques vers les solutions polysaccharidiques)

2 - Dosage des métaux dans les solutions de polysaccharides

La quantité de métaux contenue dans les solutions de polysaccharides et dans les témoins, a été dosée par la spectroscopie d'émission atomique à couplage de plasma inductif (SEA-CPI : Varian Liberty Séries II).

3 - Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des complexes ions métalliques-polysaccharides

Après lyophilisation des solutions de polysaccharides complexées par les métaux, les poudres obtenues ont été dissoutes dans le KBr à 1% et compressées pour obtenir des pastilles puis analysées par spectroscopie d'absorption en infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) ; les spectres sont enregistrés entre 400 et 4000 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} , à l'aide d'un spectromètre Bomem IR.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

A - Production des exopolysaccharides par *R. violacea*

Comme les autres microalgues rouges, *R. violacea* produit des exopolysaccharides qui constituent une capsule polysaccharidique autour des cellules visibles par contraste sous microscope optique en présence d'encre de chine (figure 29).

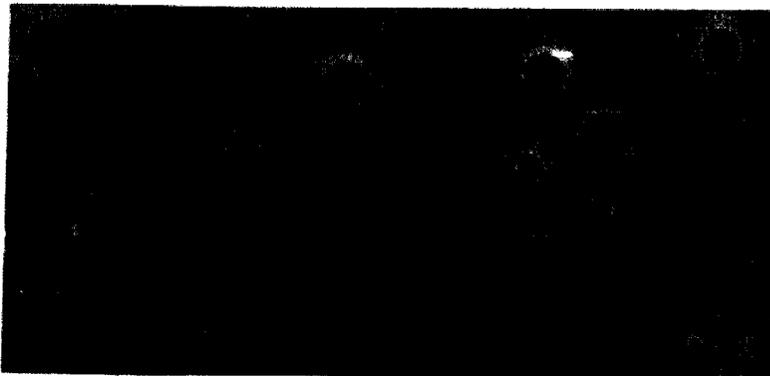


Figure 29 : Cellules de Rhodella violacea vues au microscope optique en présence d'encre de chine (X 500)

En plus de l'état physiologique de l'algue, plusieurs paramètres influent sur la production des exopolysaccharides chez les Rhodophyta unicellulaires. Chez *R. reticulata*, Arad et collaborateurs (1992) ont observé une augmentation de la production des exopolysaccharides dans les conditions de carence en azote. Nos résultats sont en accord avec ces observations. La figure 30 montre la production des exopolysaccharides en fonction de trois concentrations en azote dans le milieu de culture (35, 70 et 210 mg/l de NaNO_3). On constate que la diminution de la concentration initiale en azote provoque une augmentation de la production des exopolysaccharides.

La différence de production des exopolysaccharides est perceptible à partir du 5^{ème} et du 6^{ème} jour de culture.

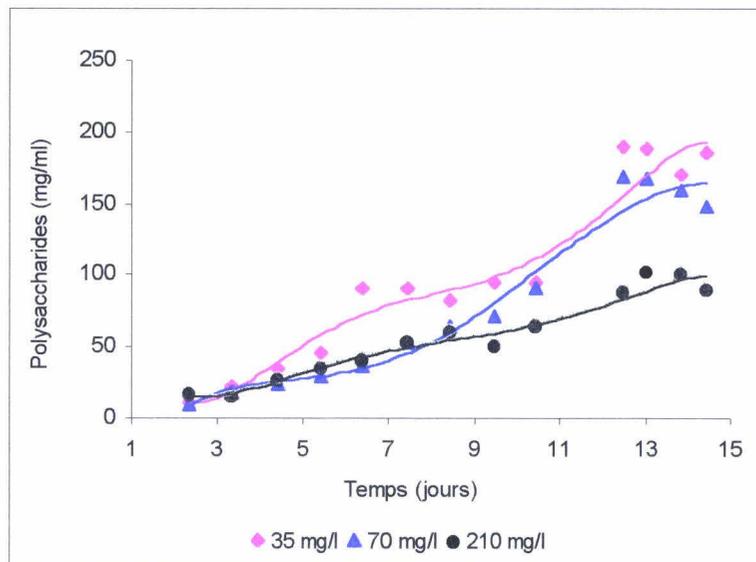


Figure 30 : Evolution au cours de la croissance de *R. violacea* de la quantité de polysaccharides dissous, lors de cultures réalisées dans des milieux à trois concentrations différentes en azote (35, 70 et 210 mg/l)

La figure 31 présente la production des exopolysaccharides rapportés au nombre de cellules. Là aussi la différence de production des exopolysaccharides par cellule est nette à partir du 6^{ème} jour de culture.

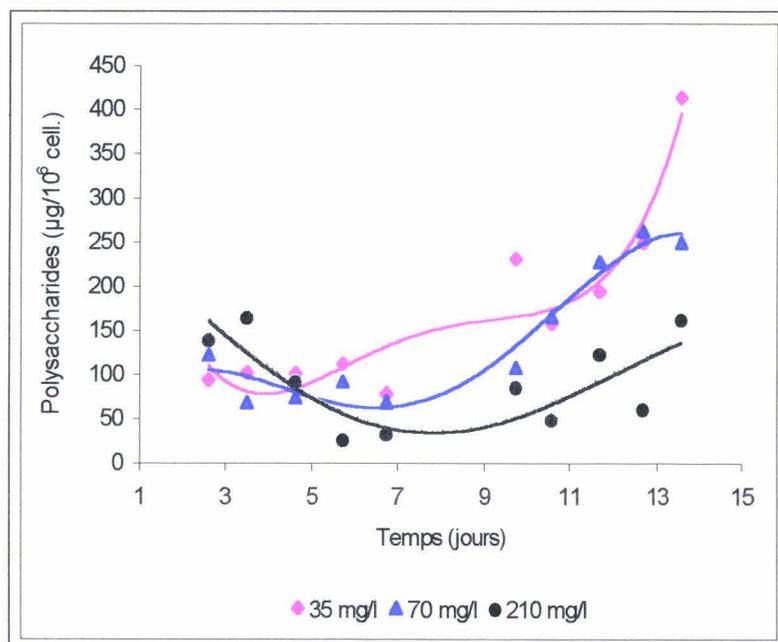


Figure 31 : Evolution au cours de la croissance de *R. violacea* de la production cellulaire en polysaccharides, lors de cultures réalisées dans des milieux de concentrations croissantes en azote (35, 70 et 210 mg/ml)

B - Polysaccharides capsulaires et extracellulaires (solubles)

1 - Composition monosaccharidique et taux de sulfate et d'acide uronique

La comparaison entre les polysaccharides solubles dans le milieu de culture et ceux qui restent collés aux cellules (polysaccharides capsulaires) ne montre pas de différence chez le *Porphyridium aerugineum* (Ramus, 1972). Pour notre part, nous n'avons pas mis en évidence chez *R. violacea* de différence significative entre ces 2 types de polysaccharides (tableau 8).

Tableau 8 : Pourcentages en acide uronique et en sulfate, et composition centésimale en monosaccharides dans les polysaccharides extracellulaires selon le mode de précipitation (au CTAB ou à l'éthanol) et dans les polysaccharides capsulaires (extraits, résiduels) (Glc : Glucose ; Gal : Galactose ; Man : Mannose ; Xyl : Xylose ; 3,O-Metxyl : 3,O-méthylxylose ; Rha : Rhamnose).

Polysaccharides	Monosaccharides (masse %)						(g/100g polysaccharides)	
	Glc	Gal	Man	Xyl	3,O-Metxyl	Rha	Acide uronique	Sulfate
<i>Extracellulaires</i>								
CTAB	8	5	8	52	14	13	12	9
Ethanol	19	5	7	38	13	12	6	11
<i>Capsulaires</i>								
Extraits	58	2	5	16	5	5	4	10
Résiduels	24	6	5	35	10	10	5	8
<i>Méthodes d'analyse</i>				CPG			3-méthahydroxybiphényl HPLC	

Le xylose est le monosaccharide largement majoritaire dans toutes les fractions ; cela est en accord avec la plupart des travaux effectués chez les microalgues rouges. La proportion élevée de glucose dans la fraction capsulaire extraite peut s'expliquer par la contamination de cette fraction par l'amidon floridéen. Par conséquent, les proportions des autres monosaccharides apparaissent relativement faibles. La fraction résiduelle correspondant aux polysaccharides de la capsule est très peu contaminée par l'amidon floridéen. La comparaison de cette fraction avec celle correspondant aux polysaccharides solubles ne montre pas de différence significative. La même constatation est faite chez le *P. aerugineum* (Ramus, 1972).

La comparaison entre les fractions obtenues à partir du polysaccharide soluble par précipitation au CTAB et par précipitation éthanolique, montre que la première est plus riche en xylose et en acide uronique, ce qui nous amène à penser que le

polysaccharide soluble excrété dans le milieu de culture par *R. violacea* est un hétéropolymère, ce qui serait en accord avec les résultats obtenus chez *R. maculata* par Fareed et Percival (1974) et par Dubinsky et collaborateurs (1992).

La quantité des sulfates représente 8 à 11 % selon la fraction polysaccharidique analysée (tableau 8). Cette variation est très peu significative. Quant aux acides uroniques, ils varient de 4 à 12% selon les fractions ; la teneur maximale de 12% est obtenue dans la fraction du polysaccharide soluble précipité au CTAB.

L'utilisation de la méthode de Stevenson et Furneaux (1991) qui préserve le pont 3,6-anhydrohexose (monosaccharides que l'on rencontre dans les polysaccharides d'origine macroalgales) lors de la préparation des acétates d'alditols, nous a permis d'exclure la présence de ce dernier dans les polysaccharides produits par *R. violacea*. Evans et collaborateurs (1974) ainsi que Fareed et Percival (1974) ont suggéré son existence dans les polysaccharides issus de *R. maculata*.

La présence du 3-O-méthylxylose et du rhamnose dans les polysaccharides de *R. violacea* est en accord avec les résultats obtenus chez *R. maculata* par Fareed et Percival (1976). La présence du mannose a été rapportée aussi par Dubinsky et collaborateurs (1992) chez *R. reticulata*.

2 - Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)

La figure 32 présente les spectres obtenus par spectroscopie IR-TF des polysaccharides solubles et capsulaires produits par *R. violacea*.

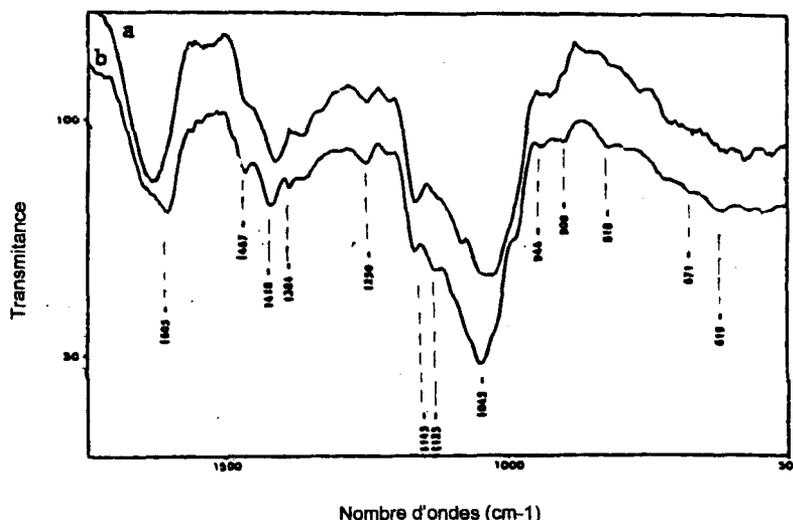


Figure 32 : Spectres infrarouges des polysaccharides capsulaires (a) et extracellulaires (b) de R. violacea

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus chez *R. maculata* et *P. cruentum* par Braud et collaborateurs. En effet, on retrouve dans tous les spectres de la figure 32, les principales bandes caractéristiques des groupements sulfates situées à 820 et 1240 cm^{-1} , des groupements carboxyliques des acides uroniques situées à 1400 et 1600 cm^{-1} . Chez *R. reticulata*, Evans et collaborateurs (1974) ainsi que Fareed et Percival (1974) n'ont pas détecté de bandes d'absorption à 1240, 820 et 850 cm^{-1} , mais des bandes à 1200, 875, et 950 cm^{-1} qui disparaissent après une désulfatation. Ils ont fait une comparaison avec les bandes d'absorption en infrarouge de l'héparine (1230, 875 et 925 cm^{-1}) et suggèrent une sulfatation sur les acides uroniques des polysaccharides chez cette algue *R. reticulata*. Pour notre part, nous détectons deux bandes à 1200 cm^{-1} et 945 cm^{-1} mais aucune dans la région de 875 cm^{-1} .

C - Affinité des exopolysaccharides (EPS) aux métaux lourds

L'épuration des effluents industriels ou des eaux contaminées par des métaux lourds ou des éléments radioactifs, présente un grand intérêt du point de vue économique et environnemental. Diverses techniques sont utilisées à cet effet, parmi lesquelles on peut citer la précipitation sous forme d'hydroxyde métallique par la chaux. Ces technologies nécessitent des procédés lourds et coûteux. Une alternative qui commence à faire ses preuves, est utilisée pour palier à ces inconvénients : c'est l'utilisation de micro-organismes comme biosorbants des métaux. Une autre voie peut être parfaitement envisageable. Elle consiste à utiliser des substances organiques telles que les polysaccharides issus des micro-organismes de type algal ou bactérien. L'avantage de l'utilisation de ces molécules est le fait de ne pas être affectées par la toxicité des milieux à traiter. Des recherches ont été effectuées sur la capacité de complexation des métaux par la biomasse algale directement (Mahan et coll., 1989 ; Hariss and Ramelow, 1990), ou par les polysaccharides d'origine algale (Geresh et coll., 1997 ; Kaplan et coll., 1987) ou bien d'origine bactérienne (Loaëc et coll., 1997). Les capacités de liaisons des ions métalliques à la biomasse et aux polysaccharides ont été évaluées par la spectroscopie d'absorption atomique, ou par une méthode électrochimique telle que « l'anodic stripping voltammetry » (Kaplan et coll., 1987).

Nous avons mis au point une méthode de mise en contact des polysaccharides et des ions métalliques par une double dialyse. En effet, la première dialyse de la solution de

polysaccharides contre des solutions de différents ions métalliques, permet la diffusion des ions à travers la membrane de dialyse vers la solution polysaccharidique. A la fin de cette étape, nous obtenons une solution de polysaccharides parfaitement saturée en ions métalliques comme le montre la figure 28 p. 55. La deuxième dialyse contre l'eau désionisée (UHQ) permet la sortie des ions ; à la fin de cette dialyse, les ions restant dans les solutions de polysaccharides sont supposés être captés par ces derniers.

La capacité des polysaccharides à fixer les différents métaux lourds par liaisons ioniques est estimée par mesure des rapports des intensités d'absorption des groupements carboxyliques qui possèdent une bande d'absorption en infrarouge à 1400 cm^{-1} lorsque ces fonctions sont sous forme sel ($\text{R-COO}^-, \text{X}^+$) sur l'intensité d'absorption à 1040 cm^{-1} , bande d'absorption des liaisons C-O-C qui reflète la quantité de polysaccharides. Ce rapport augmente quand la forme sel de la fonction carboxylique est privilégiée par rapport à la forme acide (R-COOH absorbe à 1700 cm^{-1} en IR).

En ce qui concerne l'estimation des liaisons ioniques des métaux aux groupements sulfates, nous utilisons le rapport des intensités d'absorption à 1250 cm^{-1} des groupements S=O sur les intensités d'absorption à 1040 cm^{-1} des groupements C-O-C ; dans ce cas, le rapport diminue quand les liaisons avec les ions métalliques augmentent.

Les rapports entre les intensités à 1125 et 1161 cm^{-1} sur l'intensité à 1040 cm^{-1} ont été utilisés comme témoin interne, et ils restent inchangés quelque soit le métal utilisé.

Nous avons dosé les différents métaux dans toutes les solutions de polysaccharides. Seul l'ion mis en contact avec les polysaccharides est détecté et dosé par SEA-CPI. En effet, un passage sur la résine échangeuse d'ions, « Amberlite », a permis l'élimination de toute trace de métaux et la protonation des fonctions carboxyliques de polysaccharides avant leur mise en contact avec les métaux lourds. A l'issue du traitement de la solution polysaccharidique par cette résine, nous avons titré celle-ci ; le pKa de 3,6 est obtenu à partir de la courbe de titrage (figure 33).

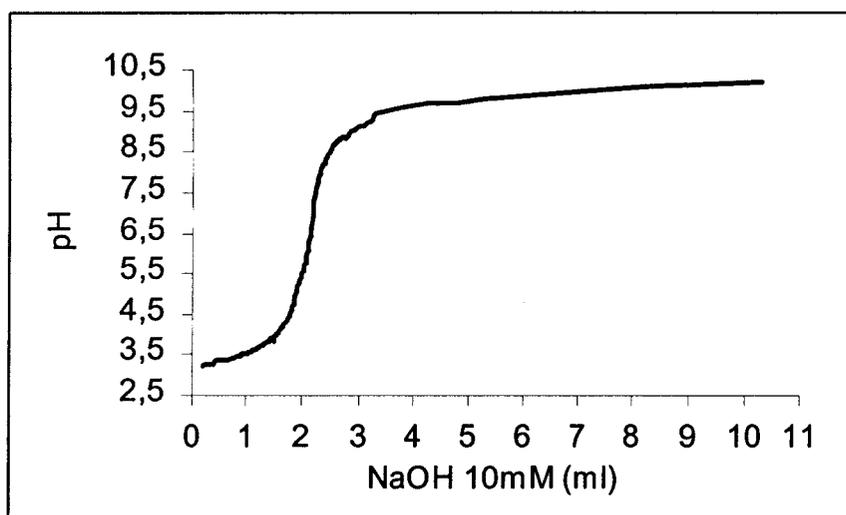


Figure 33 : Courbe de titrage de la solution de polysaccharides préalablement protonés par la résine Amberlite

Dans la figure 34 sont présentées les quantités d'ions en mole retenues par gramme de polysaccharides après leur dosage par SEA-CPI dans les solutions de polysaccharides mises en contact avec les différents ions métalliques et à l'issue de la seconde dialyse. La capacité de rétention des ions par le polysaccharide croît dans le sens suivant $Mn^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Cr^{3+} > Cr^{6+}$; cet ordre ne reflète pas leur capacité à établir une liaison ionique avec ces polysaccharides. En effet, lorsqu'on estime par la méthode IR-TF, les pourcentages d'ions liés aux polysaccharides (figure 35), on constate que le Cr^{6+} possède une forte affinité aux groupements carboxyliques, alors que le dosage direct dans la solution révèle que cet ion est le plus faiblement retenu. Cette contradiction suggère que la plupart des ions Cr^{6+} est retenue par les polysaccharides par formation de liaisons ioniques sur les fonctions carboxyliques des acides uroniques. Haglund et collaborateurs (1996) ont montré que la toxicité du Cr^{6+} pour *Gracilaria tenuistipitata* augmente avec la salinité, alors que celle du Cd^{2+} ne varie que très légèrement. La force ionique jouerait un rôle dans l'interaction entre le Cr^{6+} et l'algue, ce qui conforte notre hypothèse.

L'affinité des ions Ni^{2+} , Cr^{3+} et Cr^{6+} vis à vis de la biomasse de *Chlorella sp.* et *Oscillatoria sp.* a été déterminée par (Khan et coll., 1996) et classée dans l'ordre $Ni^{2+} > Cr^{3+} > Cr^{6+}$. Cet ordre va dans le même sens que nos résultats sur les polysaccharides de *R. violacea*.

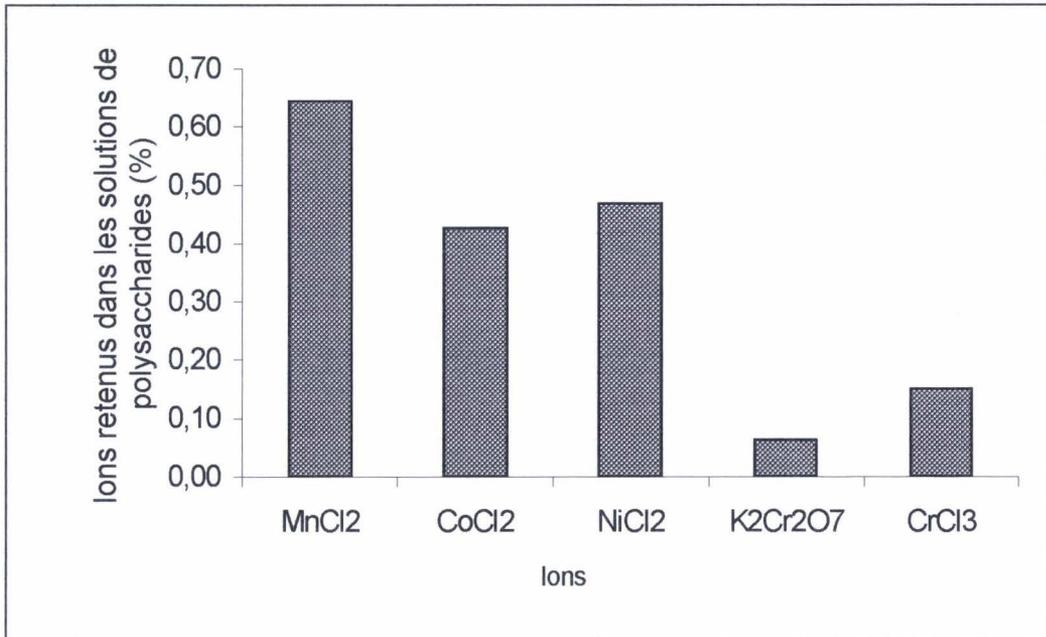


Figure 34 : Quantités d'ions dosées par SEA-CPI dans les solutions de polysaccharides et rapportées à 100 mg de polysaccharides

Les affinités des polysaccharides à l'égard des ions métalliques déterminées par l'analyse des complexes ions-polysaccharides par la méthode IR-TF, sont représentées dans la figure 35 et classées selon l'ordre suivant : $Cr^{6+} > Mn^{2+} > Cr^{+3} > Ni^{2+} > Co^{2+}$. Nous constatons que les groupements sulfates interviennent légèrement dans la liaison ions-polysaccharides. Leur taux de fixation ne dépasse par les 5% du total d'ions liés.

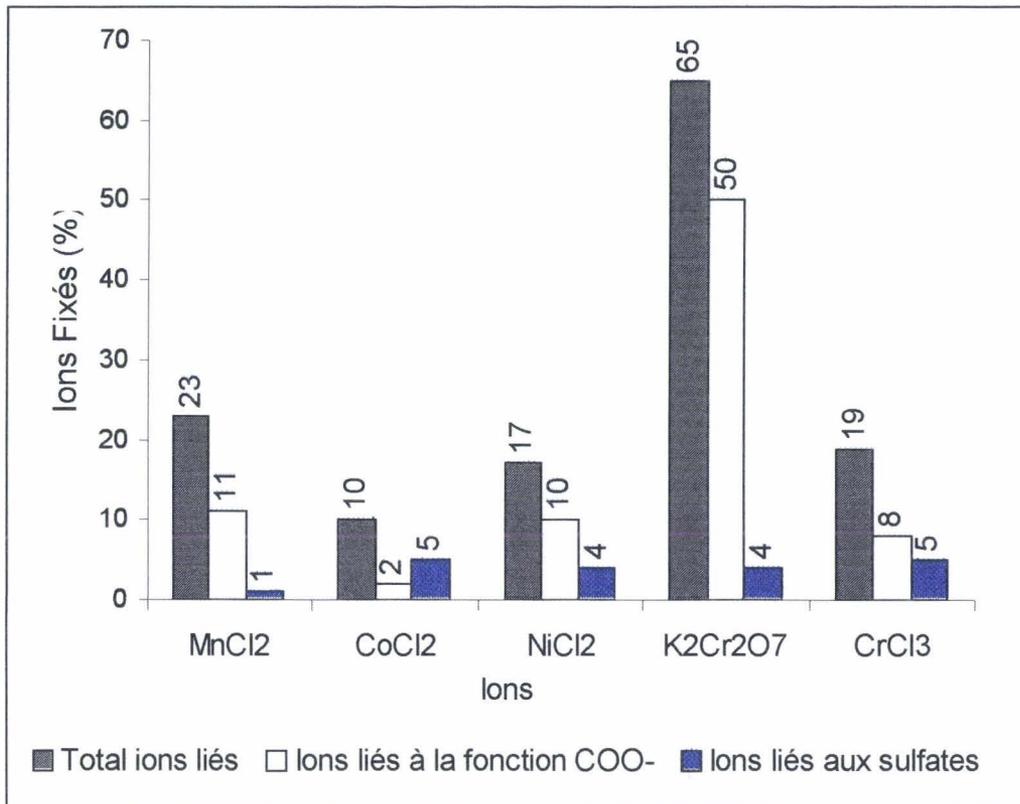


Figure 35 : Quantités d'ions fixées par le polysaccharide et quantités d'ions liées aux fonctions carboxyliques et sulfates, estimées par IR-TF

IV - CONCLUSION

Rhodella violacea produit un polysaccharide qui constitue une capsule autour des cellules. Une partie de cette capsule se libère et se dissout dans le milieu de culture. La production de ces polysaccharides est influencée par l'âge des cellules et certains paramètres écophysologiques telle la carence en azote qui favorise leur production. Les polysaccharides ont un rôle de protection des cellules et par leur excrétion permettent à celles-ci de se déplacer. Leur composition monosaccharidique est proche de celle des polysaccharides issus d'autres espèces de microalgues rouges unicellulaires. Ils sont riches en xylose et en acide uronique. Ils contiennent des monosaccharides porteurs de groupements sulfates. Ils sont dépourvus du 3,6-anhydrogalactose. La composition monosaccharidique des polysaccharides de la capsule cellulaire et celle des polysaccharides dissous ne présentent pas de différence significative. Ces polysaccharides sont des hétéropolymères acides possédant un pKa voisin de 3,6. Ils ont montré une certaine affinité aux ions métalliques. La spectrométrie IRTF utilisée pour l'analyse des complexes ions-polysaccharides, nous a permis de différencier deux propriétés : la capacité de rétention des métaux lourds par une solution de polysaccharides et l'affinité « ionique » de ces polysaccharides à ces ions métalliques.

CHAPITRE III

LES POLYSACCHARIDES DE RESERVE

I - L'AMIDON CHEZ LES VEGETAUX SUPERIEURS

L'amidon est la forme principale de réserve carbonée chez les végétaux. Il est stocké en grande quantité sous forme de grains dans les organes de réserve : les graines, les fruits, les tubercules et dans les racines de certains végétaux. Il présente un intérêt économique majeur car d'une part, il constitue un important apport énergétique chez l'homme et l'animal, d'autre part les produits de sa transformation sont très variés et utilisés dans des domaines aussi divers que les industries chimique, pharmaceutique et alimentaire. Les technologies de la transformation de ce polysaccharide sont très avancées, alors que les connaissances concernant son métabolisme et les mécanismes intervenant dans l'organisation de son grain restent relativement modestes.

A - Le grain

L'amidon est constitué essentiellement de l'amylose et de l'amylopectine. Il est présent dans la nature sous forme de granules semi-cristallins. La taille et la forme des granules diffèrent selon leurs sources botaniques. Leurs diamètres peuvent aller de quelques microns à plusieurs dizaines de microns ; leurs formes peuvent être sphériques, ovales, discoïdes, polygonales...

Le grain d'amidon commence sa croissance dans le hile. La quantité d'amylose augmente avec la maturité et la taille du grain ; à l'inverse, la longueur des chaînes branchées sur l'amylopectine diminue. Les molécules d'amylopectine dans le hile se présentent sous forme de longues branches lâchement assemblées, ce qui leur confère une faible cristallinité. Les branches externes de l'amylopectine ont une structure cristalline et une conformation en double hélice. L'amidon qui est constitué d'amylopectine aux chaînes branchées longues, comme c'est le cas chez la pomme de terre, donne une structure de type B cristallin ainsi que le révèle un spectre de diffraction aux rayons X, alors que celui constitué d'amylopectine à chaînes courtes, tel que l'amidon du riz et celui du maïs, donne une structure de type A ; l'amidon constitué

d'amylopectine à chaînes moyennes donne une structure de type C, c'est le cas de l'amidon de banane et du tapioca.

L'observation du grain d'amidon par microscopie optique ou encore par microscopie électronique après son hydrolyse chimique ou enzymatique douce, montre une architecture du grain faite de cercles ou d'anneaux de croissance sous forme de couches concentriques traduisant des régions cristallines riches en structure double hélice et des régions amorphes riches en points de branchement (figure 36).

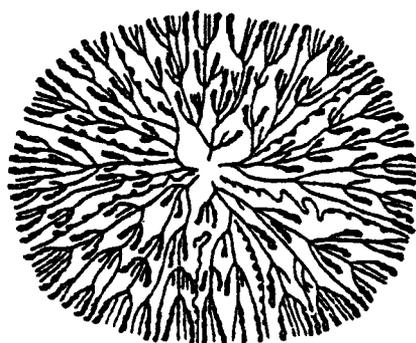


Figure 36 : Représentation schématique de l'architecture du grain d'amidon proposée par Lineback (1984)

L'amylose est distribué dans le grain selon une conformation en pelote statistique ; il possède des parties liées aux lipides, d'autres liées à l'amylopectine dans les zones cristallines et d'autres sont libres. Les lamelles qui apparaissent tantôt sombres, tantôt claires, reflètent essentiellement l'organisation structurale de l'amylopectine (figure 37).

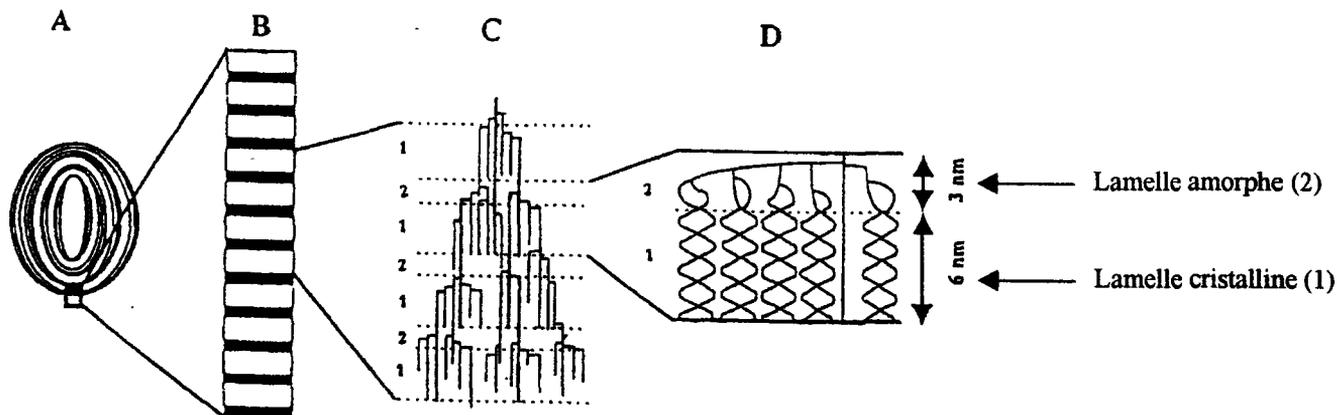


Figure 37 : Schéma général de l'organisation du grain d'amidon : A) grain formé d'une succession alternée d'anneaux concentriques avec zone amorphe et semi-cristalline ; B) extension de la zone encadrée dans A ; C) structure en grappe de l'amylopectine ; D) représentation des associations en double hélice des chaînes d'une grappe (Ball et coll., 1996)

B - Les constituants majeurs de l'amidon

1 - L'amylopectine

L'amylopectine est le constituant majoritaire du grain d'amidon (70 à 80 %). Il est le plus complexe et formé de chaînes constituées de résidus glucose liés en α -1,4, reliées entre elles par des points de branchement en α -1,6 (5 à 6 %) (figure 38)

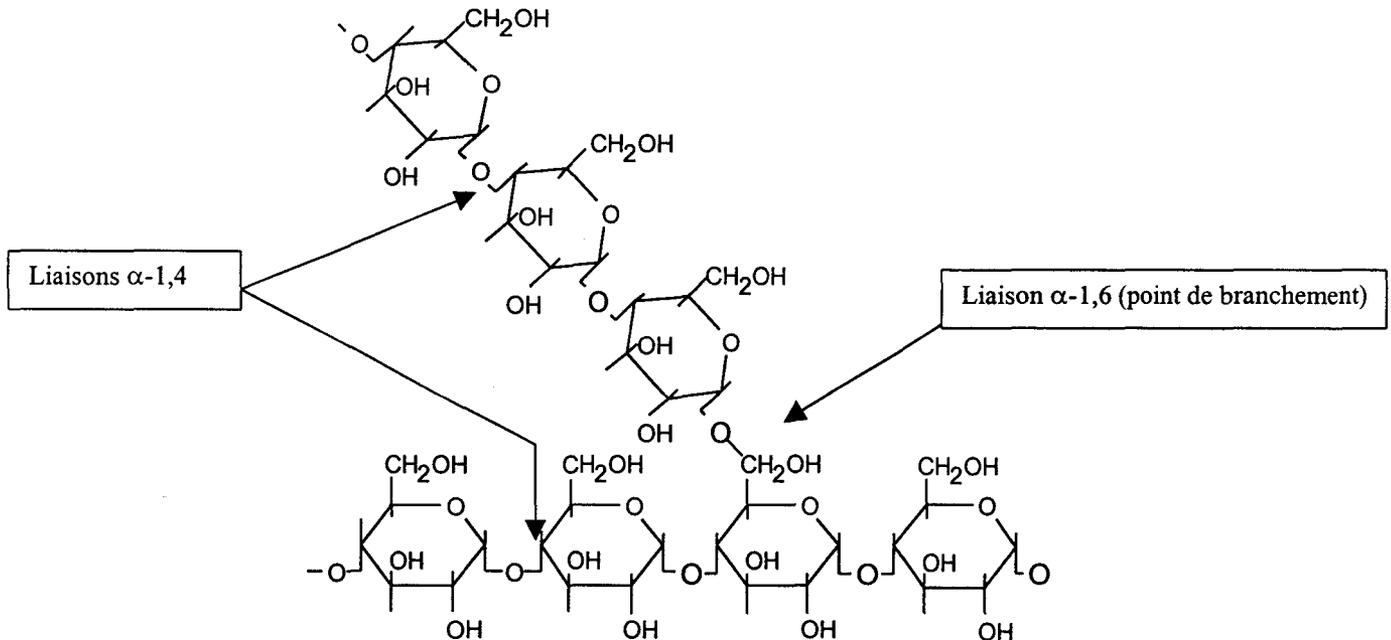


Figure 38 : Structure branchée de l'amylopectine

Ces chaînes glucaniques sont orientées de façon radiale par rapport au centre du granule et leur extrémité non réductrice s'oriente vers la surface. Elles sont classées en trois catégories : les chaînes A sont liées à la molécule uniquement par leur extrémité réductrice et ne sont pas substituées sur le carbone 6 des glucoses ; les chaînes B sont liées par leur extrémité réductrice mais portent une ou plusieurs branches en α -1,6 ; les chaînes C portent l'extrémité réductrice et représentent une seule chaîne par molécule d'amylopectine (figure 39)

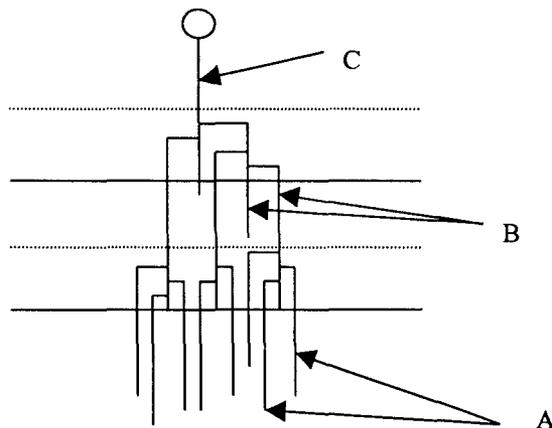


Figure 39 : Schéma simplifié représentant différents types de chaînes au sein de l'amylopectine (d'après Manners, 1989)

La masse moléculaire très élevée (10^7 à 10^8 Da) de ce polymère de glucose dépend de l'origine botanique et des conditions écophysologiques de sa synthèse (Banks et Greenwood, 1975).

2 - L'amylose

L'amylose est la fraction polysaccharidique mineure du grain d'amidon (20 à 30 %) ; sa masse moléculaire varie entre 10^4 et 10^5 Da ; elle dépend de l'origine végétale et même du type de fractionnement. Ce polymère est décrit comme ayant une structure linéaire de glucose relié par des liaisons α -1,4 osidiques, très faiblement branchée (moins de 1%) (figure 40).

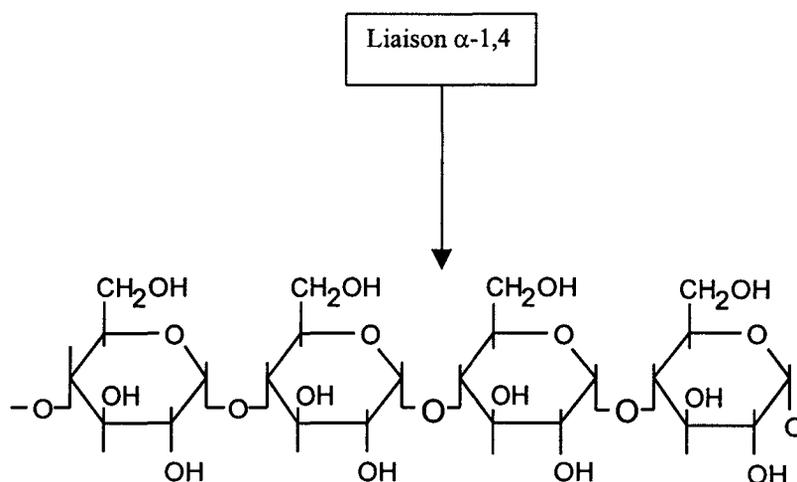


Figure 40 : Structure linéaire de la molécule d'amylose

Ce caractère linéaire confère à l'amylose des propriétés physico-chimiques distinctes de celles de l'amylopectine (tableau 9), ce qui permet leur différenciation et leur séparation. En effet, l'amylose présente une affinité pour des composés hydrophobes ou encore pour des petites molécules comme celles de l'iode qui, en se liant d'une manière réversible à l'amylose, produisent un complexe coloré « amylose-iode » dont la longueur d'onde maximale d'absorption (λ max.), d'une manière générale, est fonction de la longueur de chaîne. Banks et collaborateurs (1971) ont élaboré une échelle établissant une corrélation entre le degré de polymérisation d'un glucane linéaire et le maximum d'absorption de son complexe avec l'iode (tableau 10).

Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques de deux principaux constituants de l'amidon (l'amylose et l'amylopectine)

	AMYLOSE	AMYLOPECTINE
Représentation au sein de l'amidon	10 à 30%	70 à 90 %
Structure générale	Peu ramifiée (moins de 1%)	Ramifiée (5 à 6%)
Masse moléculaire en KDa	10 à 100	10^3 à 10^5
Couleur du complexe avec l'iode	Verte	Rouge
λ Max. du complexe avec l'iode	>600nm	$530 < \lambda_{max} < 550$
Capacité de fixation d'iode	19 à 20 %	moins de 1%
Longueur des chaînes	3 à 1000	3 à 50
Degré de polymérisation	100 à 10.000	10.000 à 100.000
Solubilité dans l'eau	Variable	Soluble
Stabilité en solution aqueuse	Rétrogradable	Stable
Digestibilité par la β -amylase	>90%	environ 60%

Tableau 10 : Corrélation entre le d.p. et le λ max. du complexe iode-glucanes linéaires (Banks et coll., 1971)

d.p. moyen	22.2	28.9	31.3	36.4	50.7	71	93	105	134	1500
λ max. nm.	496	524	530	546	574	588	594	606	610	642

Thorn et Mohazzeb (1990) ont observé que le domaine d'absorption du complexe iode-polysaccharide est fonction des longueurs des chaînes externes. En effet, plus il y a de chaînes externes plus le taux du complexe iode-polysaccharide sera grand et les longueurs d'ondes maximales d'absorption se trouveront dans le rouge ; dans le cas contraire, elles tendront vers le vert (figure 41).

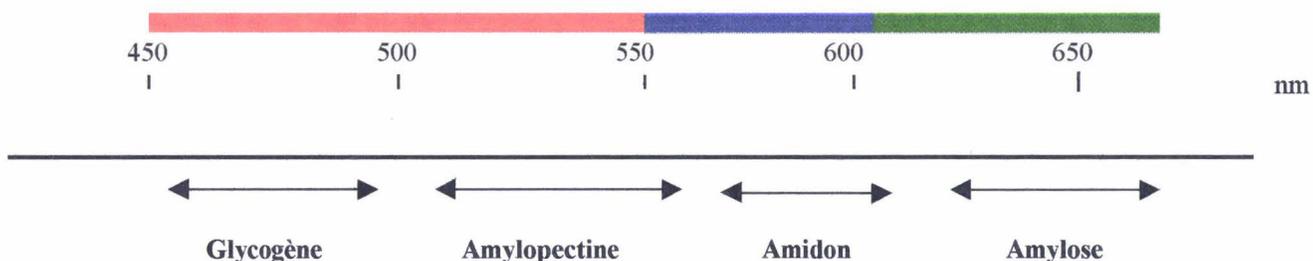


Figure 41 : Domaine d'absorption des complexes iode-polysaccharides (Thorn et Mohazzeb, 1990)

La présence de l'amylose dans le grain se fait d'une manière désordonnée, entremêlée avec l'amylopectine, et forme des complexes avec les lipides (figure 42). Sa présence n'est pas indispensable pour la formation du grain. En effet, il existe des mutants qui ne synthétisent pas d'amylose et chez lesquels le grain d'amidon est bien présent (Delrue et coll., 1992 ; Hovenkamp-Hermelink et coll., 1987).

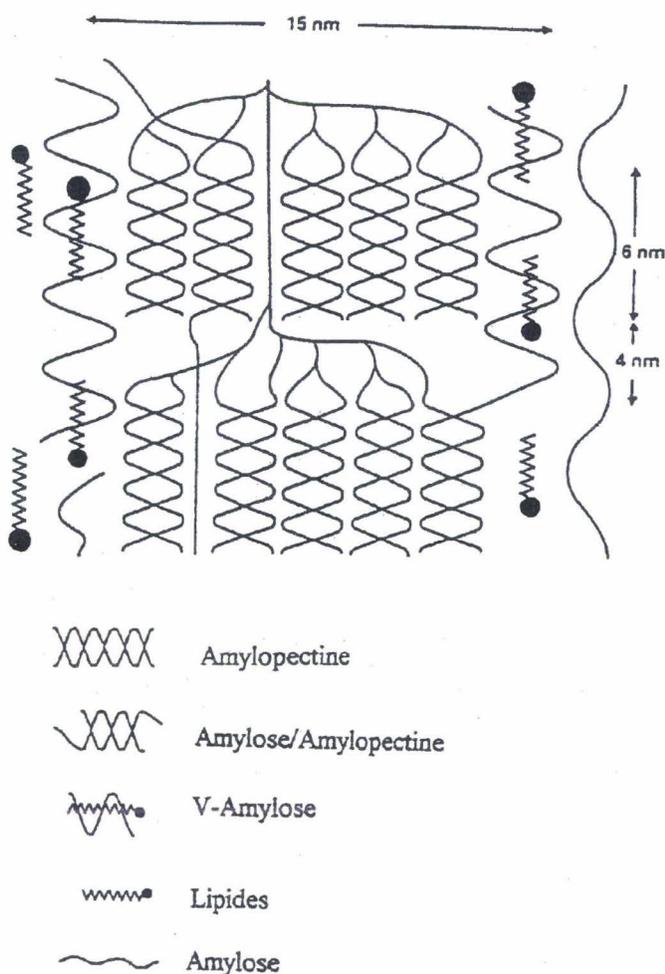


Figure 42 : Modèle de la répartition dans le grain des divers constituants de l'amidon (Blanshard, 1987)

C - Les autres constituants de l'amidon

1 - La fraction glucidique dite amylopectine II ou "matériel anormal"

Cette fraction a été révélée par fractionnement de l'amidon de *Chlamydomonas reinhardtii* sur gel de tamisage moléculaire TSK HW75 (figure 43). Elle est décrite comme matériel glucidique et nommée amylopectine de type II (ApII) (Delrue et coll., 1992 ; Fontaine et coll., 1993 ; Maddelein et coll., 1994).

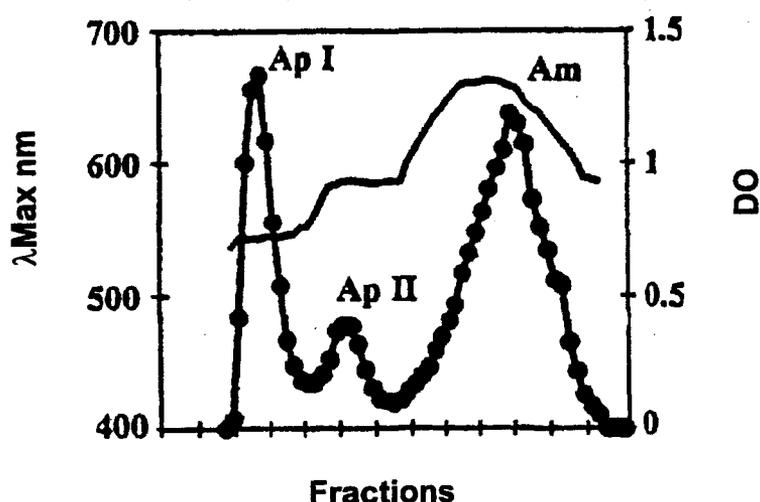


Figure 43 : Profil d'éluion d'amidon sur Chromatographie gel filtration TSK HW75 : ApI : amylopectine I ; ApII : Amylopectine II (fraction glucidique dite anormale), Am : Amylose (Libessart, 1996)

2 - La fraction non glucidique

Cette fraction représente entre 1 et 2 % de l'amidon total, selon les espèces et les procédés d'extraction ; elle est de nature lipidique, phospholipidique ou protéique.

a- La fraction lipidique

Les lipides ou phospholipides sont liés à environ 21% des chaînes hélicoïdales d'amylose et forment alors une structure dite V-amylose (Morrison et Milligan, 1982 ; Galliard, 1983) (figure 42 p. 70). Il existe une corrélation étroite entre la teneur en amylose et la quantité de lipides dans l'amidon (South et coll., 1991). Ces lipides diminuent l'interaction des chaînes d'amylose avec l'iode (Morrison et Laignolet, 1983). Cette interférence a une influence sur l'analyse de ce polymère par la complexation avec l'iode. La délipidation de l'amidon est donc nécessaire avant d'effectuer le spectre du complexe iode-amidon. Les phospholipides ont été observés dans la plupart des amidons des céréales, ils sont absents dans l'amidon des racines de légumes et de tubercules.

b - La fraction protéique

La quantité de protéines dans le grain d'amidon dépend de son origine botanique. Il en contient deux types : les protéines associées au grain et les protéines internes. La GBSS (Globule Binding Starch Synthetase) est la protéine majeure associée au grain. Son rôle dans la synthèse d'amylose est démontré. Son extraction et l'étude *in vitro* de son activité sont rapportées dans de nombreux travaux (Maddelein et coll., 1994 ; Libessart et coll., 1995).

3 - Les phosphates

Les phosphates sont portés par environ 0,3 à 0,4% de résidus glucose dans l'amidon natif de la pomme de terre, à raison d'un groupement phosphate tous les 300 résidus glucose. Ils sont principalement liés à l'amylopectine dans les zones cristallines, bien protégés contre toute attaque acide, 70% environ sont portés par le carbone C-6 et 30% par le C-3 des unités glucose (figure 44). Ce faible degré de phosphorylation de l'amidon a des effets sur ses propriétés qualitatives recherchées dans l'industrie, telles que la température de gélification, la viscosité, la solubilité et la rétrogradation. Les amidons phosphatés sont synthétisés chimiquement à des fins industrielles par l'autoclavage des amidons natifs en présence d'acide phosphorique et d'urée. Ces procédés chimiques nécessitent de grandes consommations d'énergie et sont très peu contrôlables. Les mécanismes biochimiques d'incorporation de ces groupements phosphates dans l'amidon ne sont pas encore connus ; la compréhension de ces mécanismes apporterait une aide à l'amélioration biotechnologique des qualités physico-chimiques de la molécule d'amylopectine.

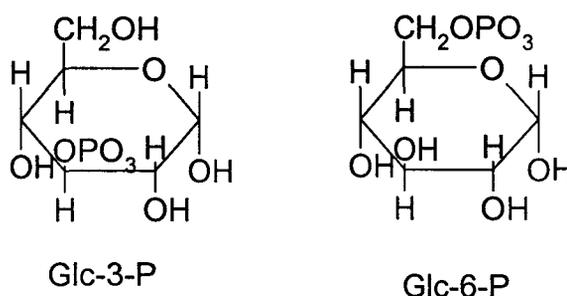


Figure 44 : Glucose 6 phosphate et glucose 3 phosphate

D - Métabolisme de l'amidon

En apparence, la biosynthèse de l'amidon semble très simple car il suffit de deux types de liaisons pour faire l'homopolymère de glucose, en l'occurrence, une liaison α -1,4 et

une liaison α -1,6. Cette simplicité n'est qu'apparente car l'homopolymère, qui a une destinée de réserve, doit être stocké sous forme de grain et l'organisation de ce grain ne doit rien au hasard. A cet égard, de nombreuses questions peuvent être posées : comment sont choisis les sites de branchement et les tailles des chaînes branchées ? Quelles sont les règles qui régissent la distribution des chaînes d'amylose au sein du grain, et leur rôle dans la structure de ce dernier, sachant que son absence n'affecte pas la formation du grain ? Comment se fait l'acheminement des substrats jusqu'aux protéines liées au grain (GBSS) et aux enzymes de branchement ?

1 - La voie de biosynthèse de l'amidon

La biosynthèse de l'amidon comporte quatre étapes essentielles dont trois sont schématisées dans la figure 45 ; la quatrième étape consiste en l'épissage de la molécule d'amylopectine (Mouille, 1997).

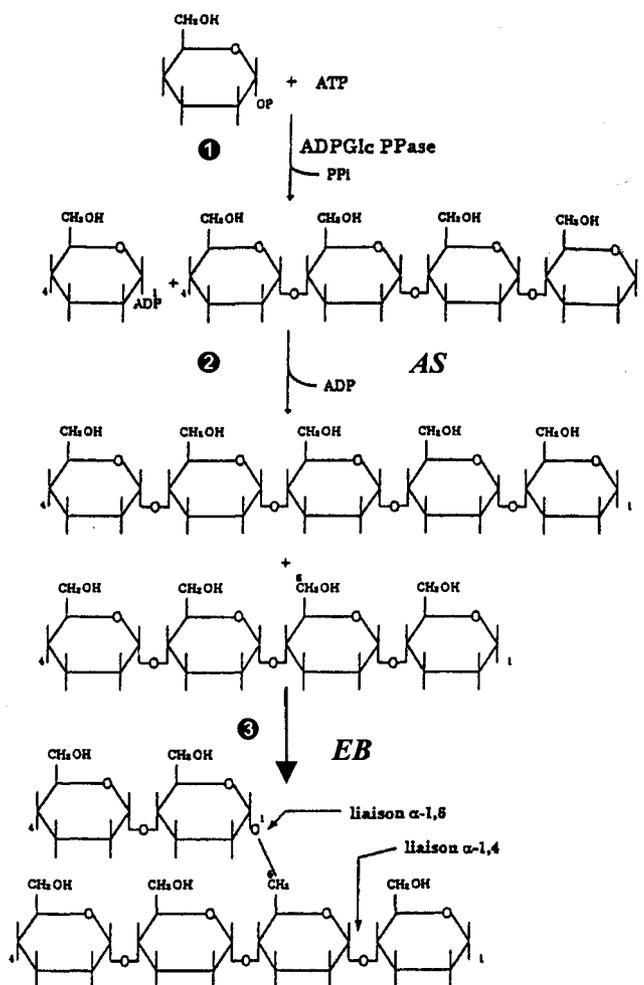
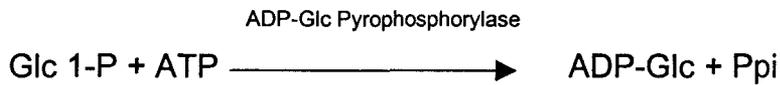


Figure 45 : Différentes étapes de la biosynthèse d'amidon :

① ADP Glc pyrophosphorylase, ② (AS) amidon synthetase, ③ (EB) enzymes de branchement

a - Synthèse du nucléotide sucre

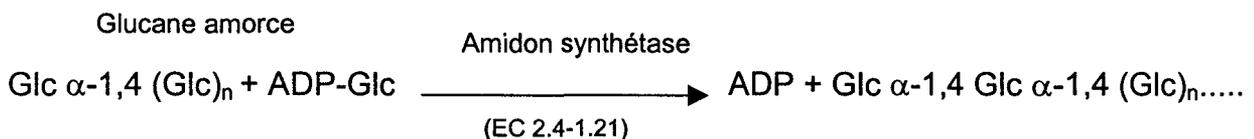
Cette première étape qui est à présent bien établie, consiste en la synthèse du précurseur nucléotide sucre tel que ADP-glucose. L'ADP-glucose pyrophosphorylase (EC2.7.7.27) est l'enzyme responsable de la synthèse de ce précurseur à partir de glucose1-P et de l'ATP. Cette étape possède un coefficient de contrôle de flux important qui peut être considéré comme limitant et contrôle cette biosynthèse.



Une diminution de l'activité ADP-Glc pyrophosphorylase chez les mutants maïs (Tsai et Nelson, 1966) ou chez le pois (Smith et Coll., 1939) entraîne une diminution de la quantité d'amidon accumulée. Une souche mutante de *Chlamydomonas reinhardtii* présente une ADP pyrophosphorylase défectueuse ; elle est insensible à l'activation par 3 PGA (3 phosphoglycérate acide) et produit moins de 10% de la quantité d'amidon synthétisée par la souche sauvage (Ball et Coll., 1991). A l'opposé, la surexpression par transgénèse d'un gène bactérien codant pour une enzyme à activité spécifique anormalement élevée (Stark et Coll., 1992) a permis l'obtention de plants de pommes de terre produisant une plus grande quantité relative d'amidon.

Van Den Koornhuysse et Collaborateurs (1996) ont montré chez *Chlamydomonas reinhardtii*, qu'une simple diminution de l'ADP-glucose avait en plus de la diminution de la quantité d'amidon accumulée, un effet sur sa structure, notamment sur la proportion d'amylose et sur la distribution en longueurs de chaînes dans l'amylopectine.

b - Etape d'élongation



L'amidon-synthétase impliquée dans cette réaction existe sous deux formes, une forme soluble appelée amidon-synthétase soluble (ASS) ou " Soluble Starch Synthase "(SSS) et une forme liée au grain ou " Granule-Bound Starch Synthase " (GBSS). Elle transfère le glucose de l'ADP-Glc sur l'extrémité non réductrice du glucane amorce.

b1 - L'amidon synthétase liée au grain (GBSS)

La GBSS est l'enzyme responsable de la synthèse d'amylose. En effet, chez les mutants tels que le maïs Waxy, l'absence d'amylose est corrélée avec l'absence de la GBSS (Nelson et Rines, 1962) ; cette corrélation a été montrée chez d'autres mutants de pomme de terre (Hovenkamp-Hermelink et Coll., 1987) et de *Chlamydomonas reinhardtii* (Delrue et coll., 1992).

b2 - Les amidons synthétases solubles (ASS)

Deux amidons synthétases solubles (ASSI et ASSII) ont été mises en évidence dans l'albumen du grain de maïs par Preiss et Boyer (1980).

Ces deux enzymes utilisent ADP-glucose comme substrat mais leur affinité aux amorces qu'elles allongent est distincte. En effet, l'ASSI présente une meilleure affinité pour le glycogène alors que l'ASSII a une préférence pour l'amylopectine, et d'une manière générale, la forme I est plus affine aux courtes chaînes (chaîne de type A de l'amylopectine). La forme II aurait plus d'affinité pour les chaînes longues de type B.

c - Etapes de branchement

Les enzymes de branchement sont à l'origine des liaisons α -1,6 qui rendent la structure de l'amidon complexe. Ces enzymes de type transférase clivent le glucose en α -1,4 puis transfèrent la chaîne libérée sur une autre chaîne glucosidique en créant une liaison α -1,6 glucosidique.

2 - Dégradation de l'amidon

La dégradation de l'amidon a pour but de fournir aux tissus une source de carbone sous forme d'oses simples. Bien que de nombreuses enzymes de dégradation aient été caractérisées, la régulation de la dégradation de l'amidon selon les cycles jour/nuit reste encore inconnue.

La forme granulaire insoluble et compacte de l'amidon lui confère une résistance à des hydrolyses enzymatiques ; la présence des phosphates est aussi un obstacle à l'action des enzymes (Morrison et Karkaras, 1990). Parmi les enzymes hydrolysant l'amidon, dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau 11, nous citerons les α -amylases, la β -amylase, les phosphorylases, l' α -1,4-glucose phosphorylase,

l' α -glucosidase, les enzymes de débranchement, la maltose phosphorylase et la D-enzyme.

Tableau 11 : Enzymes intervenant dans le catabolisme d'amidon des végétaux supérieurs (Steup, 1990)

Enzymes	Identification EC	Actions sur le glucane
α -glucosidase	3.2.1.20	Hydrolyse d'oligosaccharides en maltose et glucose
α -amylase	3.2.1.1	Hydrolyse les liaisons α -1,4
β -amylase	3.2.1.2	Hydrolyse à partir de l'extrémité non réductrice en libérant le maltose
Enzymes de débranchement		Hydrolyse les liaisons α -1,6 du glucane
α -1,4 glucose phosphorylase	2.4.1.1	Production de Glc-1-P et de dextrines limites, en présence de l'orthophosphate
Maltose phosphorylase	2.4.1.8	Production de Glc-1-P et de Glc à partir de maltose et d'orthophosphate
D-Enzyme	2.4.1.25	Transfert du groupement maltosyl d'un maltotriose sur un α -1,4-D-glucane et libération du Glc

3 - Métabolisme général de l'amidon

La transformation du carbone inorganique en substances de réserves et l'épuisement du carbone dans ces réserves à destination d'autres voies métaboliques (figure 46), est l'une des activités métaboliques principales des végétaux photosynthétiques. Ce cycle alternant l'élaboration des réserves et leur métabolisme est régi par le rythme circadien.

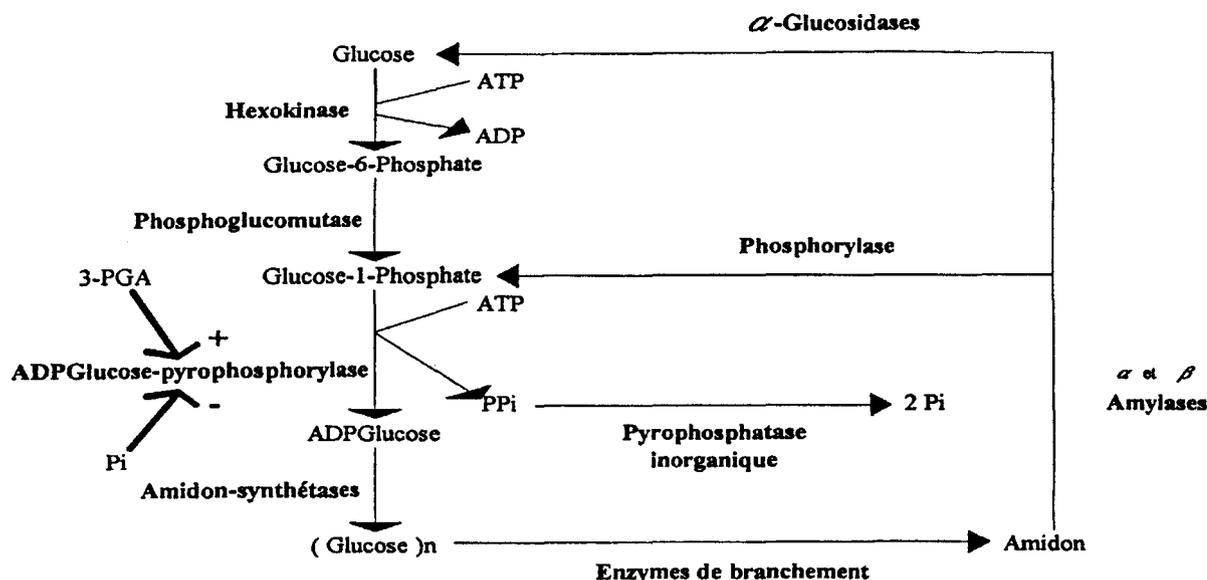


Figure 46 : Schéma général du métabolisme de l'amidon chez les végétaux supérieurs

E - Intérêt économique de l'amidon

L'amidon est la seconde source de polysaccharides après la cellulose dans la biosphère ; sa production annuelle pour l'alimentation et l'utilisation industrielle est estimée supérieure à 10^9 tonnes (Morrison et coll., 1990). Ses principales origines sont les céréales telles que le blé, le riz, le maïs, l'orge et le sorgho, ainsi que la pomme de terre, les racines et quelques légumes. Une grande partie d'amidon est consommée directement sans transformation préalable. Son utilisation comme colle à papier ou comme agent d'empesage ou son application dans le textile, ne nécessite pas une grande technologie et ne lui donne pas une grande importance industrielle. Néanmoins, l'évolution des technologies de sa transformation est en pleine progression. En effet, la première crise du marché du saccharose a profité à l'amidon à partir duquel s'est développée la production de sirop de glucose.

L'amidon a vu sa valeur industrielle augmentée avec le développement d'enzymes permettant sa transformation en sous produits d'intérêt industriel important, et qui trouvent leur application dans de nombreux domaines allant de l'agroalimentaire à la chimie, la pharmacie et la cosmétologie. La valeur ajoutée de ces sous produits de l'amidon encourage leur production ainsi que le développement des procédés de leur fabrication.

1 - Quelques domaines d'application de l'amidon

a - Transformation industrielle de l'amidon en Glucose / fructose

Cette transformation est réalisée en trois étapes : un chauffage d'amidon dans l'eau et deux actions enzymatiques successives à l'aide d'une α -amylase et d'une glucoamylase pour l'obtention du sirop de glucose qui subit l'action de la glucose isomérase, pour la transformation du glucose en fructose (figure 47).

Les grains d'amidon en suspension aqueuse sont d'abord éclatés par chauffage sous pression à des températures dépassant 100°C . L'empois d'amidon ainsi obtenu va subir dans un premier temps l'action d'une α -amylase ; il est donc intéressant de disposer d'enzymes thermostables. A cet égard, l' α -amylase issue de la bactérie

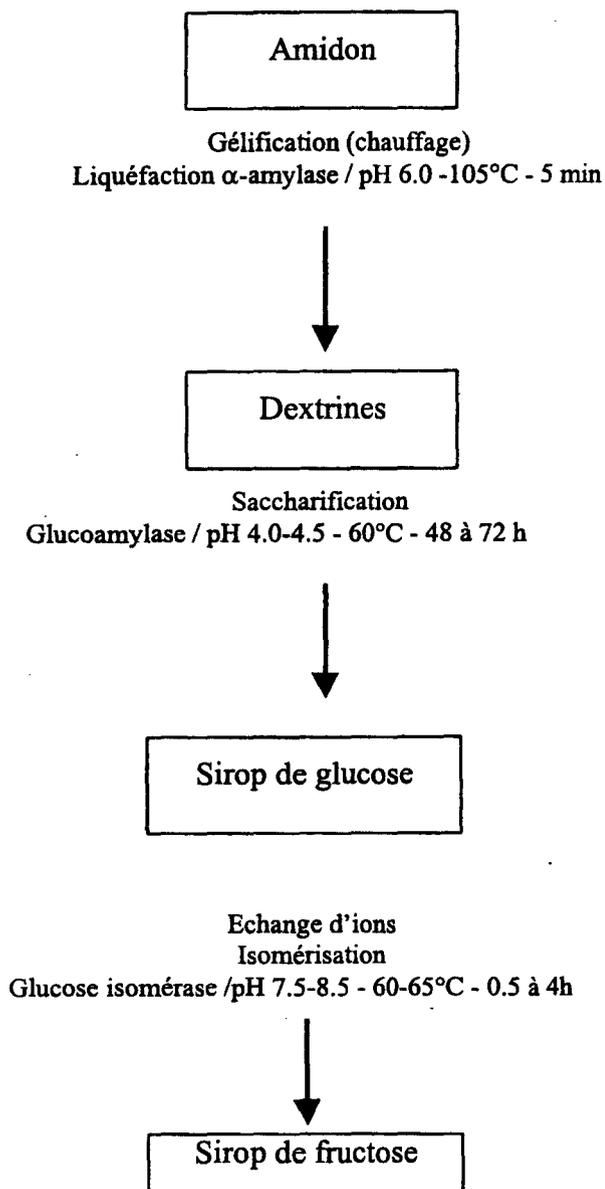
Bacillus licheniformis est douée de cette propriété ; elle est commercialisée par la firme danoise NOVO sous le nom « TERMAMYL ».

Dans une deuxième opération est effectuée une saccharification à l'aide d'une glucoamylase. Cette enzyme nécessite une température plus basse de l'ordre de 60°C et un pH acide entre 4.0 et 4.5, ce qui exige un ajustement du milieu à la fin de la réaction par l' α -amylase. Une fois l'amidon hydrolysé en glucose, il peut être transformé en fructose par l'action d'une glucose isomérase. L'intérêt de cette opération est l'obtention du fructose qui possède un pouvoir sucrant deux fois et demie plus élevé que celui du glucose.

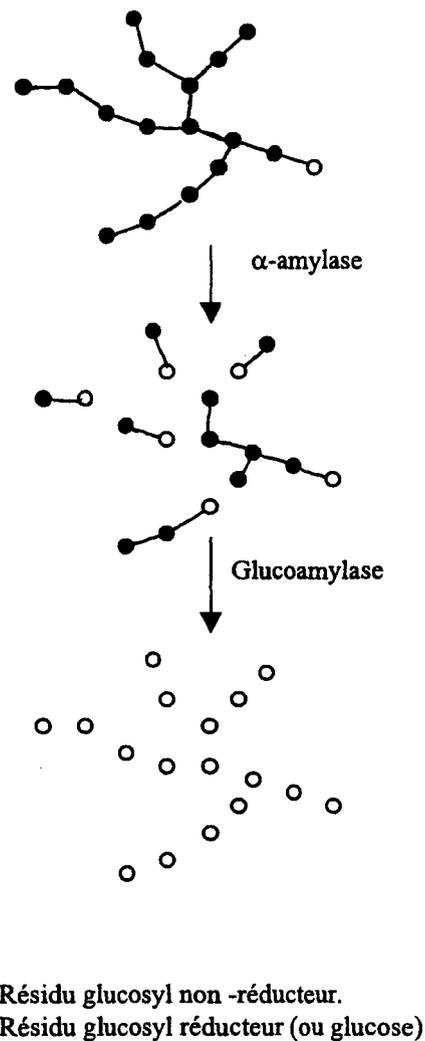
Le procédé industriel de fabrication des sirops de glucose et de fructose à partir de l'amidon nécessite une certaine maîtrise. En effet chaque étape exige des conditions particulières de pH et de température (figure 47).

b - Production d'édulcorants

Outre ces trois réactions enzymatiques (liquéfaction, saccharification, isomérisation) majeures que subit l'amidon pour sa transformation industrielle, il existe d'autres actions enzymatiques dont l'exploitation est mineure mais qui ne cessent de se développer, comme par exemple l'élaboration de produits ayant une composition oligosaccharidique particulières. Tel est le cas des β -amylases, en particulier la maltogénase de *Bacillus steorothermophilus*, première enzyme recombinante produite industriellement par la firme NOVO, qui en association avec les enzymes de débranchement (pullulanase, isoamylase), permettent la production de sirops à haute teneur en maltose. A partir de ce substrat est produit le maltitol, édulcorant non cariogène et hypocalorique, utilisé en particulier dans la confiserie sans sucre.



Procédé industriel de la fabrication de sirops de glucose et de fructose à partir d'amidon



Hydrolyse d'amidon en glucose.

Figure 47 : Procédés industriels de la transformation de l'amidon en sirops de glucose et de fructose

c – Autres molécules

Les cyclodextrines sont obtenues par dégradation enzymatique de l'amidon par fermentation de plusieurs microorganismes dont *Bacillus macerans* et *Bacillus subtilis*. L'amidon peu hydrolysé est fragmenté par des enzymes cyclodextrines glycosyltransférases (CGT) en anneaux de 6 à 8 unités glucose. Les α -cyclodextrines contiennent 6 unités glucose, les β 7 unités et les γ 8 unités glucose. En France, la cyclodextrine β est fabriquée par la société ROQUETTE. Les cyclodextrines sont autorisées comme additifs alimentaires au Japon depuis 1976. Les deux pays leaders dans leur production sont le Japon avec NIHON SHOKUIN KAKO et la Hongrie avec CHINOIN.

L'originalité des cyclodextrines réside dans le fait que leur cavité centrale est hydrophobe alors que la molécule est hydrophile à l'extérieur. Cette structure permet la formulation de complexes d'inclusions stables avec des substances organiques, des sels, des halogènes. La molécule « piégée » voit sa solubilité et sa stabilité augmentées vis-à-vis de la chaleur, de l'oxydation, de l'hydrolyse.

Les applications dans le domaine alimentaire sont très prometteuses : stabilisation des substances volatiles aromatiques, augmentation de la solubilité, protection contre l'oxydation, suppression des goûts et amertumes désagréables. En effet, la cyclodextrine β est utilisée pour désamériser les jus de pamplemousse. Cette désamérisation se fait par passage de jus de fruit à travers une colonne garnie de cyclodextrines β .

II - L'AMIDON CHEZ LES RHODOPHYTA

L'amidon floridéen découvert par Kützing (1843) est le polysaccharide de réserve extraplastidial des Rhodophyta. Contrairement à l'amidon qui est synthétisé dans le chloroplaste, l'amidon floridéen est toujours intracytoplasmique et extraplastidiale (Nagashima et coll., 1968, 1971 ; Lee, 1974 ; Borowitzka, 1978 ; Tsekos, 1982). Il est synthétisé sur des particules dans le cytoplasme en étroite association avec le réticulum endoplasmique (Borowitzka, 1978 ; Tsekos, 1982). La formation d'un complexe amidon floridéen-mitochondries-dictyosome est observé chez *Batrachospermum* lors d'une

activité cellulaire accrue (Aghajanian, 1979). Comme chez les plantes en général, il est accumulé pendant la phase lumineuse de photosynthèse, et dégradé pendant la phase obscure. Chez les algues rouges agarophytes, l'azote stimule la production du floridoside (Galactosyl Glycérol) et inhibe la synthèse de l'amidon et de l'agar. Les algues semblent ajuster la balance du flux de carbone entre les polysaccharides de réserve et les polysaccharides de structure en réponse aux changements de conditions écophysologiques (Chopin et coll., 1991). Le stress constitué par l'augmentation de la salinité provoque la dégradation de l'amidon floridéen (Yu, 1992). Chez *Rhodella reticulata*, le suivi du carbone radioactif a montré que l'amidon floridéen est formé principalement pendant la phase exponentielle de croissance (Kroen et Ramus, 1990) car habituellement la synthèse se fait pendant la phase stationnaire de croissance.

Craigie (1974) a effectué une revue bibliographique au sujet de l'amidon floridéen. Meeuse et collaborateurs (1960) ont étudié 30 espèces d'algues rouges ; ils ont conclu que *Constantinea subilifera* est la plus productrice d'amidon floridéen et ils ont remarqué son absence chez le *Porphyra naindumd*, le *Porphyra perphorata* et le *Bangia fuscopurpurea*. Ils trouvent que la différence avec d'autres polysaccharides de réserve tels que l'amidon de plantes supérieures et le glycogène, réside dans le fait que l'amidon floridéen ne forme un gel que lorsqu'il est chauffé longuement à ébullition. Ils trouvent également que l'amidon floridéen possède une structure branchée équivalente à celle du glycogène.

L'amidon floridéen est stocké sous forme de grain dont le nombre et la taille sont très variables. Chez *Seirospora griffithsiana*, la taille du grain varie de 0,3 à 1,7 μM de long (Sheath et coll., 1981a) et chez *Odonthalia floccosa* de 1 à 25 μM de long (Meeuse et coll., 1960). Sa position cytoplasmique n'affecte pas les caractéristiques du grain. De plus, sa distribution autour d'organites cellulaires tels que le chloroplaste ou le pyrenoïde a été utilisée pour établir un diagramme d'évolution des espèces productrices de cet amidon (Lee, 1974). L'amidon floridéen a été isolé à partir de *Dilsea edulis* par Peat et collaborateurs (1959a). Ces auteurs ont montré, en utilisant l'oxydation périodique, l'existence de liaisons de branchements en α -1,6 qui sont espacées par 9 résidus glucose liés en α -1,4. Ils ont également montré l'existence du nigérose (3-O- α -Dglucopyranosyl-D-glucose) dans un hydrolysât d'amidon floridéen séparé par chromatographie sur papier. Ils ont démontré ainsi l'existence d'une faible portion

néanmoins significative de liaisons α -1,3 (ce type de liaison a été montré dans le maïs Waxy et le glycogène par Wolfrom et Thompson en 1956). Ils ont attribué à cet amidon une structure similaire à celle d'un glycogène moins branché, plutôt qu'à celle de l'amylopectine. Le nombre de glucoses entre chaque branchement diffère selon les conditions expérimentales (Peat et coll., 1959b).

Greenwood et Thompson (1961) ont préparé et purifié l'amidon floridéen par ultracentrifugation à partir de *Dilsea edulis*. Ils l'ont classé dans le groupe de l'amylopectine plutôt que du glycogène, en se basant sur les caractéristiques telles que les longueurs moyennes de chaînes branchées (18,6 résidus glucose) et celles des chaînes internes (7 résidus), le PM $7 \cdot 10^8$ Da, λ max. 550 nm glc et l'angle de déviation de la lumière polarisée $[\alpha]_{\Delta} + 190^{\circ}$.

La R-enzyme issue de la fève ne débranche pas le glycogène d'origine animale ; par contre, elle est active sur l'amidon issu de *Dilsea edulis* ou de maïs Waxy (Peat et coll., 1959b). Cette enzyme n'a pas été détectée chez les gracilariales. L'amidon floridéen ne précipite pas en présence de la globuline issue de la farine de haricot " Jack-bean meal ", mais il existe une faible réactivité de l'amidon floridéen vis à vis de la globuline et de la concanavaleine-A (Manners et Wright, 1962). Toutes ces raisons ont amené ces auteurs à considérer que la structure de cet amidon est de type amylopectine plutôt que glycogène.

Turvey et Simpson (1966) ont purifié l'amidon floridéen à partir de *Corallina officinalis* par la méthode de chromatographie échangeuse d'ions, et ont montré ainsi qu'il possédait des caractéristiques structurales équivalentes à d'autres amidons floridéens, à savoir un complexe avec l'iode de λ max. 500 nm, une β -amylolyse de 44 %, un angle de rotation de la lumière polarisée $[\alpha]_{\Delta} + 171,2^{\circ}$ et une longueur moyenne de chaînes branchées de 11,8 résidus glucose.

Ozaki et collaborateurs (1967) ont extrait cet amidon à partir de *Jaculator maximus* par fractionnement par le chlorure de benzalkonium ; ils lui ont trouvé un angle $[\alpha]_{\Delta} + 195,5^{\circ}$, une λ max. du complexe avec l'iode de 550 nm et une longueur de chaîne de 17 résidus glucose.

Whyte (1971) a montré que les caractéristiques physico-chimiques de ce polysaccharide dépendaient de sa pureté ; il l'a isolé à partir de *Rhododymenia pertusa* par DEAE-Sephadex et a trouvé un $[\alpha]_D$ de $+177^\circ$, une λ max. du complexe iode-polysaccharide de 500 nm et une longueur de chaîne de 12 à 13 résidus glucose.

Nagashima et collaborateurs (1968) ont montré qu'une préparation de chloroplastes de *Serraticardia maxima* est capable de synthétiser l'amidon floridéen en présence de l'ADP ou UDP-glucose et un amidon amorce. L'utilisation de précurseurs radioactifs a permis de montrer que l'amidon floridéen est formé à partir d' $H^{14}CO_3$ pendant la phase éclairée photosynthétique et sa quantité diminue pendant la phase sombre exclusivement respiratoire (Nagashima et coll., 1969). L'ADP-glucosyltransférase est exclusivement liée au grain d'amidon (Nagashima et coll., 1971) ; elle transfère préférentiellement l'ADP-glucose par rapport à l'UDP ou GDP-glucose.

Fredrick (1967) a fractionné un extrait de *Rhododymenia pertusa* sur gel d'électrophorèse. Il a montré l'existence de la phosphorylase, de l'enzyme de branchement et de deux glucosyltransférases qui sont capables de transférer chacune soit l'ADP soit l'UDP-glucose. La phosphorylase, l'ADP-Glc transférase et l'amylase étudiées chez le *Porphyridium purpureum* montrent une étroite relation entre le métabolisme de l'amidon floridéen et les autres métabolismes : protéique, nucléique, et activité photosynthétique (Sheath et coll., 1979a). Cette relation est établie aussi avec le cycle cellulaire et l'alternance jour/nuit (Sheath et coll., 1979b, 1981b). En effet, l'ADP-Glc transférase et la phosphorylase diminuent pendant la phase obscure.

La première description de l'amylose dans l'amidon floridéen a été faite par McCracken et Cain (1981) qui ont étudié l'amidon issu de 10 espèces d'algues rouges. Ils n'ont pas révélé l'amylose chez *Rhodella maculata* et *Rhodosorus marinus*, deux algues proches de *Rhodella violacea*. Sur les 10 espèces étudiées, seules deux révèlent la présence d'amylose dans leur amidon floridéen, le *Porphyridium aerugineum* et le *Flintiella sanguinaria* dans des proportions respectives de 10% et 23%.

Le tableau 12 résume quelques propriétés de l'amidon floridéen chez différentes espèces d'algues d'après plusieurs auteurs.

Tableau 12 : Données sur les maximum d'absorption λ max. du complexe iode-amidon floridéen et les longueurs moyennes des chaînes branchées. * : valeurs que nous avons calculées à partir des valeurs données par les auteurs, en utilisant la formule de Fales (1980)

Auteurs et années	Origine	λ max.	Longueur de chaîne en résidu Glc
Peat & Turvey (1959)	<i>Dilsea edulis</i>	530 nm	--- [31,33]*
Greenwood & Thompson (1961)	<i>Dilsea edulis</i>	550 nm	18,6 [38,71]*
Turvey & Simpson (1966)	<i>Corallina officinalis</i>	500 nm	11,8 [24,37]*
Ozaki et coll. (1967)	<i>Jaculator maximus</i>	550 nm	17 [38,71]*
Whyte (1971)	<i>Rhodomenia pertusa</i>	500 nm	12 à 13 [24,37]*

III - MATERIEL ET METHODES

A - Matériel biologique

- *Rhodella violacea* (Kornmann) est mise en culture dans un milieu d'eau de mer artificielle (E.M.A., annexe 1), agitée par bullage avec de l'air filtré stérilement, sous une lumière continue d'une intensité de $150 \mu\text{mole photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et à une température de 20°C.
- *Porphyridium cruentum* a été cultivé dans les mêmes conditions que *R. violacea*.
- *Gracilaria gracilis* a été récoltée à Audresselles.

B- Extraction de l'amidon floridéen

1 - A partir de *Rhodella violacea*

Pour la production de l'amidon, nous avons utilisé deux milieux de culture, l'un enrichi en azote, l'autre déficient ou sans source d'azote ajoutée. Dans ce dernier cas, la production d'amidon est maximale. Sur les cultures de deux litres de *Rhodella violacea*, on effectue un comptage au compteur Coulteur ; une première centrifugation à 3000xg, 10 min à 4°C, et un lavage du culot dans les tampons d'extraction (Tris 10mM EDTA 1mM pH 7,5) sont nécessaires pour éliminer les sels issus des milieux de culture. Le culot cellulaire lavé est repris dans un minimum de tampon ; les cellules sont éclatées à la presse de French sous une pression de 10000 PSI ; deux passages sont nécessaires. Le lysât est centrifugé à 10000xg, 20 min. à 4°C. On obtient alors un culot qui contient l'amidon et les débris cellulaires. Pour séparer ces deux composants, le culot est repris par une solution de Percoll (Pharmacia) à 9/1 V/V (Percoll/culot), puis centrifugé à 10000xg, 30 min. à 4°C. Le culot contenant l'amidon est ensuite lavé trois fois par de l'eau distillée. Le culot final est repris dans l'eau pour subir un dosage à l'amyloglucosidase.

2 - A partir de *Porphyridium cruentum*

Le *Porphyridium cruentum* est une Rhodophyta unicellulaire de l'ordre des Porphyridiales et de la famille des Porphyridiaceae. La taille de ses cellules varie entre 4 et 9 μm de diamètre. Sur le plan évolutif, cette algue se trouve tout en bas de

l'échelle d'évolution. L'extraction de l'amidon floridéen à partir du *Porphyridium* est effectuée de la même manière que chez *Rhodella*.

3 - A partir de *Gracilaria gracilis*

L'extraction de l'amidon à partir d'une macroalgue présente une difficulté supplémentaire due à la présence de la paroi polysaccharidique bien structurée autour des cellules.

Les *Gracilaria gracilis* sont des algues rouges appartenant au phylum des Rhodophyta, à l'ordre des Gigartinales et à la famille des Gracilariaceae. Elles sont récoltées à Audresselles. Elles ont été nettoyées dans une cuve à ultrasons pour les débarrasser des épiphytes, puis broyées au « mixeur blinder » à puissance maximale avant d'être broyées à l'aide d'un broyeur Potter. Ensuite, trois passages à la presse de French sont nécessaires pour extraire l'amidon des cellules. La suite de la purification de l'amidon est identique à celle utilisée chez les microalgues.

C - Dosage de l'amidon

L'amidon est dosé à l'aide d'un kit commercialisé par la firme Boehringer Mannheim. Le principe de ce dosage est basé sur l'hydrolyse de l'amidon en glucose par une amyloglucosidase. Une hexokinase phosphoryle le glucose sur le carbone C-6 et donne le Glc-6-P qui est à son tour oxydé en gluconate-6-P par une enzyme, la Glc-6-P déshydrogénase, à coenzyme NADP qui sera réduit en NADPH,H⁺. Cette dernière réaction est suivie à 365 nm au spectrophotomètre (Hitachi, U2000).

D - Détermination des spectres des complexes polysaccharides-Iode

Les glucanes dont le degré de polymérisation (d.p.) est supérieur à 12 unités glucose, forment un complexe avec l'iode qui possède un spectre d'absorption dans le visible. La longueur d'onde maximale d'absorption de ce complexe est caractéristique du polysaccharide et elle est fonction de son d.p. (figure 41 p. 70) Les spectres

d'absorption sont réalisés entre 400 et 700 nm sur un mélange de 100 µl de solution polysaccharidique et de 400 µl de solution de Lugol (0,2 % en KI ; 0,02 % en I₂).

E - Fractionnement de l'amidon sur colonne de filtration sur gel Sépharose CL2B

Dix milligrammes d'amidon sont mis en suspension dans 500 µl de DMSO 100% et chauffé 30 min à 100°C. L'amidon est précipité par 4 volumes d'éthanol absolu pendant une nuit à -20°C. Après centrifugation 30 min 1000xg, le culot obtenu est repris par 2 ml d'une solution NaOH 10 mM. Après complète dissolution par une agitation vigoureuse, la solution est déposée sur une colonne (150 x 2 cm) remplie par le gel de filtration (Sépharose CL2B, commercialisé par Pharmacia) dont le domaine de fractionnement varie de 10⁵ à 2.10⁷ Da. L'élution se fait par une solution de NaOH 10 mM avec un débit de 40 ml/h. Des fractions de 2 ml sont collectées sur lesquelles est effectué un spectre d'absorption du complexe iode-polysaccharide entre 400 et 700 nm. Cela permet d'établir le profil de tamisage moléculaire de l'amidon total. Les fractions contenant l'amylose sont réunies ainsi que celles contenant l'amylopectine puis elles sont dialysées 48 heures à 4°C dans des boudins de dialyse dont le « cut-of » varie entre 6000 et 8000 Da. Les deux solutions d'amylose et d'amylopectine sont lyophilisées à l'issue de la dialyse.

F - Détermination de la distribution en longueur de chaînes de l'amylopectine et de l'amylose

L'amylose et l'amylopectine obtenues par fractionnement d'amidon sur une colonne gel de filtration CL2B, vont subir une dégradation enzymatique de type isoamylasique (glycogène 6-glucanohydrolase) qui coupe les liaisons α-1,6 glucosidiques dans l'amylopectine et le glycogène.

1 - Débranchement par l'isoamylase

10 mg de polysaccharides sont dissous dans 200 µl de DMSO 100% à 100°C. Ensuite, on complète à 2 ml par une solution tampon acétate de sodium 55 mM, pH 3,5, pour

obtenir une concentration en DMSO de 10%. La solution ainsi obtenue est placée à 45°C pendant 5 min. A partir d'une solution concentrée d'enzymes isoamylases de *Pseudomonas amyloideramosa* ATCC 21262 (59000 U/mg.ml) (Laboratoires Biochimiques Hayashibara), on prélève 4 µl que l'on introduit dans 500 µl de tampon acétate de sodium 55 mM, pH 3,5 à la température de 45°C pour obtenir 200 U enzymatiques. Cette solution est introduite dans les 2 ml d'échantillon ; on obtient ainsi une solution finale de 20 U enzymatiques/mg de substrat polysaccharidique. La réaction de débranchement s'effectue à 45°C et elle est suivie par le dosage au DNS des sucres réducteurs libérés selon la méthode de Miller (1959).

2 - Analyse des produits libérés par la réaction de débranchement

Après avoir arrêté la réaction par chauffage à 100°C 10 min, l'hydrolysate est scindé en deux fractions qui vont être analysées selon deux méthodes chromatographiques. En effet, pour analyser les sucres issus du débranchement, nous avons utilisé deux méthodes chromatographiques : la chromatographie de filtration sur gel, TSK HW50 (commercialisée par Phamacia) pour déterminer la distribution des chaînes dont le degré de polymérisation (d.p.) est supérieur à 20 résidus glucose, et la chromatographie liquide haute performance d'échange d'anions à détection ampérométrique pulsée (HPAE-PAD) pour les chaînes dont le d.p. est inférieur à 20 résidus glucose.

a - Chromatographie de filtration sur gel TSK HW50

Le fractogel TSK HW50 (F) (Merck) est un gel de tamisage moléculaire qui possède un domaine de fractionnement allant de $5 \cdot 10^2$ à $1 \cdot 10^4$ Da.

Une partie de l'hydrolysate isoamylasique est déposée sur une colonne (1,6X45cm) remplie par le fractogel TSK HW50 (F), équilibrée dans le DMSO 10%. L'élution est effectuée à un débit de 30 ml/h ; des fractions de 2 ml sont collectées en sortie de colonne. Sur chaque fraction, nous réalisons un spectre d'absorption du complexe iode-polysaccharide. Les valeurs de λ max. nous permettent d'estimer les longueurs de chaînes polysaccharidiques selon la formule de Fales (1980) qui a établi une corrélation linéaire entre la λ max. du complexe iode-oligosaccharide et la longueur de cet oligosaccharide. Cette relation est donnée par la formule suivante :

Relation entre le d.p. et le λ max. du complexe Iode-polysaccharide (Fales, 1980) :

$$d.p. = 3290/(635-\lambda \text{ max.})$$

Cette relation est valable pour les petits glucanes linéaires ($10 < d.p. < 80$), elle est habituellement utilisée pour les λ max. < 590 nm.

Les résultats sont comparés aux d.p. de l'échelle de Banks et collaborateurs (1971).

b - Chromatographie d'échange d'anions à détection ampérométrique pulsée (HPAE-PAD)

Cette méthode nécessite deux étapes :

b1 - Dessalage de l'hydrolysate

Le dessalage est indispensable avant l'injection en HPAE-PAD (système HPLC-Dionex). A cet effet, l'hydrolysate est centrifugé 10 min à 4000xg à 30°C avant de déposer le surnageant sur une colonne (50 x 1,6 cm) remplie d'une phase de gel filtration de type Fractogel TSK HW40 (S) (commercialisé par Merck), dont le domaine de fractionnement est de 10^2 à 70.10^2 Da. L'élution est effectuée par une solution d'acide acétique 0,5% à un débit de 1 ml/min. La détection en sortie de colonne est assurée par un détecteur réfractométrique. Les glucanes dessalés sont ensuite concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif à 37°C avant d'être analysés en système HPLC-Dionex.

b2 - Injection en HPLC-Dionex

La séparation des oligosaccharides contenus dans la fraction glucanique obtenue par dessalage sur TSK HW40 (S), est assurée par le système HPLC-Dionex équipé d'une colonne CarboPac-PA 100 DIONEX (4 x 250 mm) munie d'une pré-colonne « CarboPac guard » et d'un détecteur ampérométrique pulsé (PAD II). L'élution est effectuée avec un débit de 0,5 ml/min par un gradient linéaire en partant d'un mélange 5% d'acétate de sodium 1 M et 95% de soude 100 mM jusqu'au mélange contenant 35% d'acétate de sodium 1 M et 65% de soude 100 mM.

c - Electrophorèse après dérivation des glucanes

Cette technique développée par O'Shea et Morell (1996) est basée sur la dérivation des oligosaccharides par un fluorophore et leur séparation par électrophorèse. Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec la « Cooperative Research Centre For Plant Science » à Canberra en Australie.

Une quantité de glucanes (125 µg) préalablement débranchés par l'action de l'isoamylase, est mise en suspension dans une solution contenant 5 µl d'acide 8-amino-1,3,6-pyrénétrisulfonique (APTS) 0,2 M dans l'acide acétique 15%, et 5 µl de cyanoborohydrure de sodium 1 M. Les glucanes sont ensuite placés à 40°C. Après une nuit, 90 µl de tampon (Tris 0,04 M, acide borique 0,04 M, urée 6 M, pH 8,6) sont ajoutés aux glucanes dérivatisés. 1µl d'échantillon est alors déposé sur un gel de polyacrylamide dont la composition est la suivante : 20% (acrylamide : bisacrylamide, 37,5 : 1 ; v : v), Tris 0,089 M, EDTA 0,002 M, urée 8,3 M, pH 8,6.

L'appareil utilisé pour l'électrophorèse est un MacroPhor (Pharmacia). La migration, d'une durée d'une heure et demie, est réalisée à 4°C avec une puissance constante de 1250 W dans le tampon (Tris 0,089 M, acide borique 0,089 M, EDTA 0,002 M, pH 8,6). La fluorescence est ensuite mesurée à l'aide d'un fluorimètre « Molecular Dynamic 595 équipé d'un logiciel « Image Quant ».

G - Détermination des liaisons osidiques par méthylation

La méthylation consiste en la substitution de tous les groupements hydroxyles libres des polysaccharides par des groupements méthoxyles. La méthode de référence est celle de Hakomori (1964) utilisant l'hydruire de sodium NaH pour former l'anion dismyl ($\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2\text{-Na}^+$) qui catalyse l'ionisation des groupements hydroxyles nécessaires à la réaction par l'iodure de méthyle (ICH_3) agent de méthylation. Cette méthode a servi de base pour l'élaboration d'autres méthodes de méthylation adaptées à différentes molécules. Pour ce travail, nous avons choisi la méthode au butyllithium de Blankeney et Stone (1985).

H - Analyses par RMN du proton

Une quantité de glucanes (0,5 à 10 mg) préalablement dessalée et lyophilisée est mise en suspension dans 500 µl de D₂O puis lyophilisée. Cette opération est réalisée deux fois pour effectuer l'échange des protons des hydroxyles par du deutérium. Les glucanes échangés sont dissous à 80°C pendant 24 heures dans le mélange DMSO deutéré [(CD₃)₂SO / D₂O](80 / 20)]. Les spectres du proton sont réalisés à 80°C par le spectrophotomètre Bruker AM-400WB muni d'une sonde Dual. La résonance du proton est utilisée pour estimer le taux de branchement qui se fait par le rapport des aires des pics attribués au proton anomérique de la liaison α-1,6 qui résonne à 4,9 ppm sur les aires des pics correspondant aux liaisons α-1,4 (5,15 à 5,25 ppm).

I - Analyse en infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Pour faire l'étude en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, nous avons préparé des pastilles de KBr. A 99 mg de KBr, on ajoute 1 mg de polysaccharide ; on pulvérise l'ensemble dans un mortier en porcelaine, on introduit la poudre obtenue dans une pastilleuse et on exerce un pression d'environ 14000PSI. Les pastilles sont mises dans un dessiccateur en présence de P₂O₅ pour éliminer toute trace d'eau dont la présence perturbe l'analyse en infrarouge. Les spectres sont enregistrés entre 400 et 4000 cm⁻¹ à l'aide d'un spectromètre IR BOMEM avec une résolution de 2 cm⁻¹

J - Etudes enzymatiques

1 - Extraction des protéines liées au grain

Les protéines liées au grain sont extraites à partir de 4 mg d'amidon mis en suspension dans 80 µl d'une solution d'extraction (β-mercaptoéthanol 5 % (v/v) et SDS 2 % (p/v)). L'ensemble est placé dans un bain-marie à 100°C pendant 10 min. Après une centrifugation 30 min. à 10000xg, on retire le surnageant et le culot subit une deuxième extraction par 40 µl de la même solution d'extraction.

2 - Dosage de l'activité synthétase liée

L'activité amidon synthétase liée (GBSS) catalyse le transfert sur les extrémités non réductrices du glucane amorce du résidu glucose porté par le nucléotide sucre. Nous avons utilisé deux nucléotides sucre, ADP-Glc et UDP-Glc ; la réaction se fait à 30°C pendant deux heures. La composition des milieux réactionnels se trouve en annexe 8.

Après l'arrêt de la réaction par addition de 3 ml d'éthanol à 70%, on filtre sur les membranes de type « Glass Filter GF/F (Whatman) » de 0,7 µm de maille, et on rince 4 fois à l'aide de 5 ml d'éthanol à 70%. Les filtres sont mis en présence de 3,5 ml de liquide de scintillation (Lipoluma). Le comptage de la radioactivité retenue sur les filtres est réalisé par un compteur à scintillation liquide (BECKMAN).

IV – RESULTATS ET DISCUSSIONS

A - Production de l'amidon floridéen par *Rhodella violacea*

La présence des pigments hydrosolubles, les phycobiliprotéines, responsables de la couleur pourpre chez *Rhodella violacea*, permet de compenser la carence en azote du milieu de culture. En effet, lorsque la quantité d'azote diminue dans le milieu de culture, les phycobiliprotéines se dégradent et fournissent de l'azote aux cellules. Dans ces conditions et à la fin du temps de culture, les algues perdent complètement leur couleur pourpre pour devenir vertes (couleur des chlorophylles) (Figure 13 page 27). Une levée de carence en azote permet le rétablissement de la couleur naturelle des algues. Du fait de la présence des phycobiliprotéines, les algues cultivées dans des milieux sans azote ne seront que partiellement carencées. Cependant, elles produisent environ 8 fois plus d'amidon que celles cultivées en présence d'azote, et environ 3 fois plus que la souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii* . cultivée en milieu carencé. (tableau 13).

*Tableau 13 : Quantité d'amidon produite par Rhodella et Chlamydomonas dans les milieux avec azote (+N) et sans azote (-N) ; * : données Libessart (1996)*

Origine de l'amidon	µg d'amidon / 10 ⁶ cellules
<i>R. violacea</i> -N	172
<i>R. violacea</i> +N	20
<i>C. reinhardtii</i> . -N*	40 à 60
<i>C. reinhardtii</i> +N*	1

B - Fractionnement de l'amidon par chromatographie en filtration sur gel CL2B

Le profil chromatographique obtenu après fractionnement sur gel filtration CL2B de l'amidon délipidé, montre deux fractions (figure 48) : la fraction exclue correspond à l'amylopectine et représente 70% pour le milieu N-, son complexe avec l'iode possède

un λ_{max} . à 525 nm ; la fraction retenue correspond à l'amylose, elle est éluée dans un plus grand volume se traduisant par un pic plus large et elle représente 30% du polysaccharide issu des algues cultivées dans le milieu -N ; la réaction de cette fraction amylosique avec le lugol donne un complexe iode-amylose qui possède une λ_{max} . d'absorption à 650 nm.

Ce profil comparé à celui obtenu sur l'amidon de *Chlamydomonas reinhardtii*, ne présente aucune différence significative. Les seules différences observées résident dans les λ_{max} . des complexes avec l'iode des polysaccharides contenus dans les deux fractions séparées et dans le pourcentage des deux fractions de l'amidon total (tableau 14).

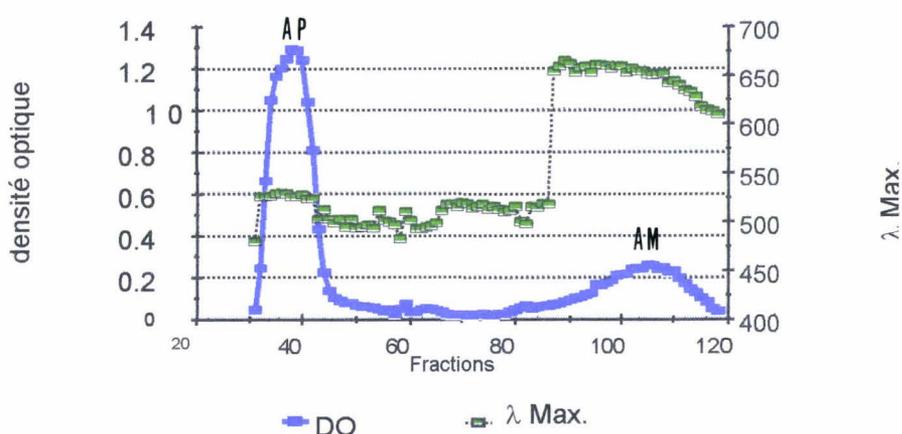


Figure 48 : Profil de la séparation sur chromatographie en gel de filtration CL2B de l'amidon floridéen produit en condition de carence en azote par *Rhodella violacea* (un spectre du complexe iode-polysaccharides est réalisé en 400 et 700 nm pour chaque fraction de 3ml, la densité optique est enregistrée au pic du maximum d'absorption -ou λ_{max} .-). La fraction exclue correspond à l'amylopectine, la fraction retenue à l'amylose

Polysaccharide	Origine	λ_{max} . (nm)	%	d.p.**
Amylopectine	<i>R. violacea</i> -N	525	68	29,91
	<i>R. violacea</i> +N	548	90	31,82
	<i>C. reinhardtii</i> -N	555*	65 à 85*	42,60
	<i>C. reinhardtii</i> +N	570*	>95*	50,62
Amylose	<i>R. violacea</i> -N-	650	30	>1500
	<i>R. violacea</i> +N	645	12	>1500
	<i>C. reinhardtii</i> -N-	644*	15 à 35*	>1500
	<i>C. reinhardtii</i> +N	-	<5*	>1500

Tableau 14 : Propriétés comparées de l'amylose et de l'amylopectine issus de *R. violacea* et *C. reinhardtii* cultivés dans des milieux avec azote (+N) ou sans azote (-N).).* : données selon Libessart et coll. (1995) ; ** : d.p. moyen des chaînes B, calculé selon la formule de Fales (1980) ($d.p. = 3290 / (635 - \lambda_{max})$)

C - Etude des branchements de l'amylopectine

Après dessalage par dialyse des solutions d'amylose et d'amylopectine issus du fractionnement sur CL2B, celles-ci sont lyophilisées. Sur les poudres obtenues après cette opération, nous avons effectué une série d'analyses.

1 - Etude par RMN du proton

Le spectre RMN du proton a été réalisé sur les fractions d'amylopectine et d'amylose préalablement purifiées à partir de l'amidon floridéen de *Rhodella violacea*. Par l'intégration du pic correspondant au proton anomérique qui résonne à 4,6 ppm et porté par le carbone C1 engagé dans la liaison α -1,6, nous obtenons un taux de branchement d'environ 3,6% (figure 49 A). L'amylopectine issue de l'amidon de *Chlamydomonas reinhardtii* possède quant à elle un taux de branchement de 5 à 6%. Nous remarquons l'absence de ce pic à 4,6 ppm dans le spectre obtenu sur l'amylose (figure 49 B) ; cela signifie que ce polysaccharide est très peu branché. Cette technique ne permet pas l'évaluation du taux de branchement inférieur à 1,5%.

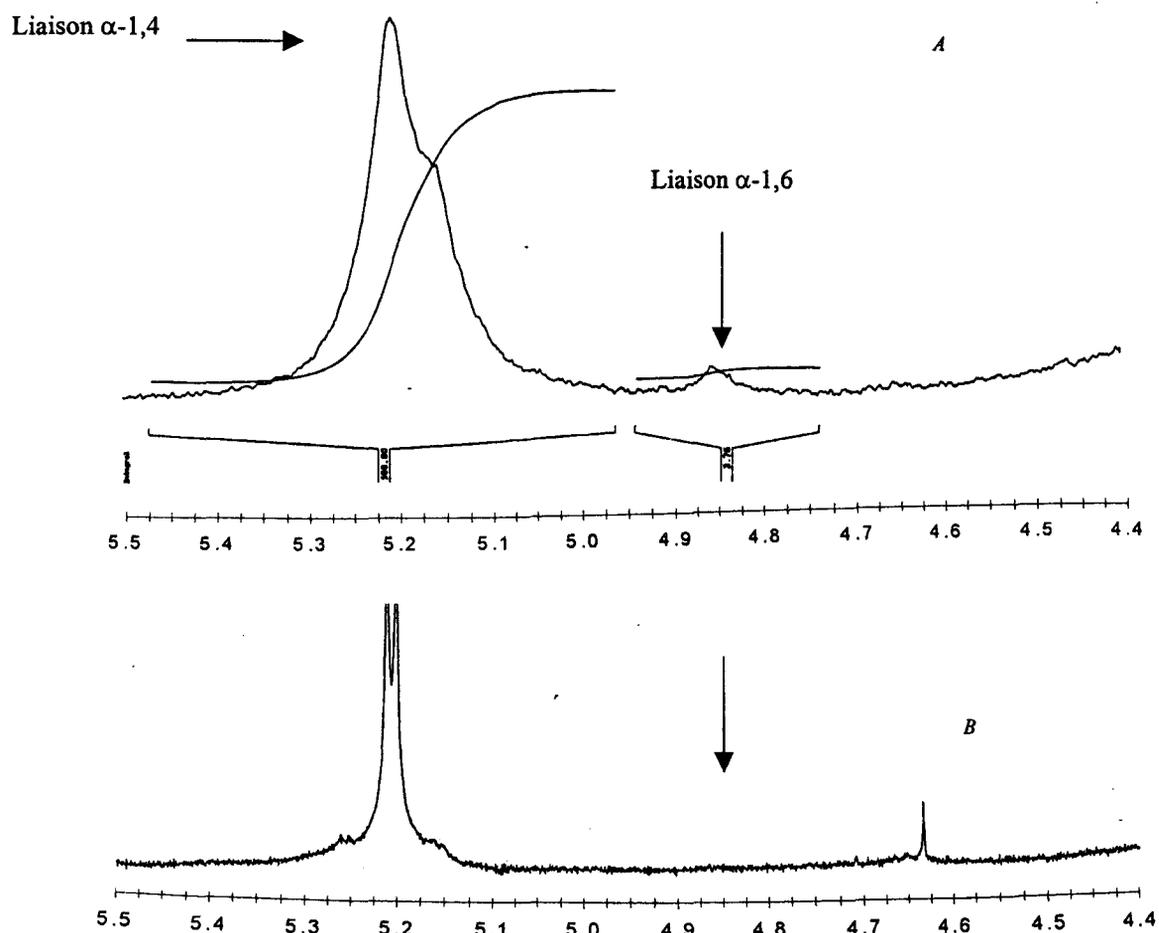


Figure 49 : Spectres RMN ^1H : A) amylopectine ; B) amylose, issus de l'amidon floridéen de *R. violacea*

2 - Distribution en longueurs de chaînes

L'amylopectine purifiée a été débranchée par l'isoamylase de *Pseudomonas* dont la cinétique est représentée dans la figure 50.

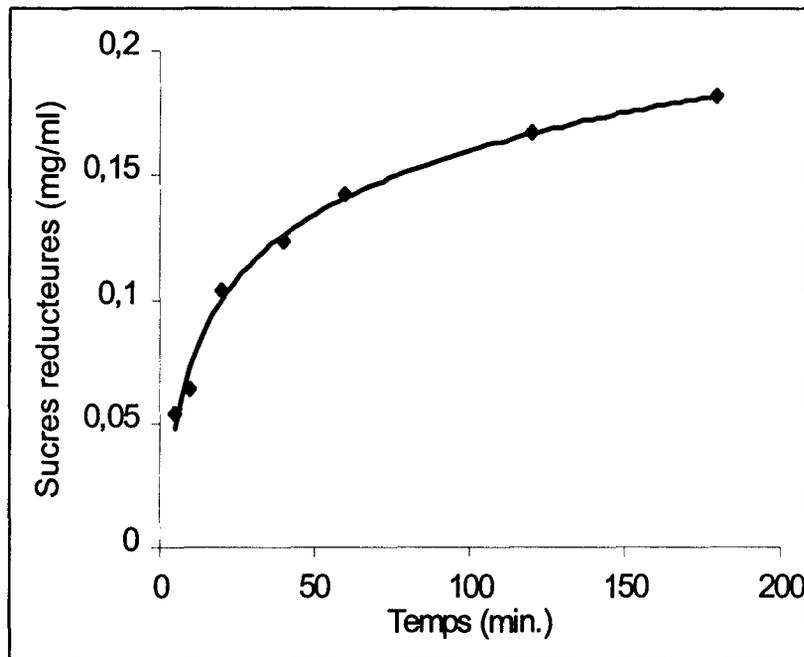


Figure 50 : Cinétique d'hydrolyse par l'isoamylase de Pseudomonas de l'amylopectine purifiée par fractionnement d'amidon floridéen de R. violacea sur CL2B

a - Chromatographie de tamisage moléculaire TSK HW50

Le profil du fractionnement du produit de la réaction isoamylasique sur la chromatographie de gel filtration TSK HW50 (utilisée pour fractionner les chaînes débranchées dont le degré de polymérisation est supérieur à 20 résidus glucose) est présenté dans la figure 51. Sur chaque fraction est effectué un spectre d'absorption du complexe iode-oligosaccharide. Les λ max. obtenues sont utilisées dans la formule de Fales (1980) pour estimer le d.p. moyen des oligosaccharides présents dans chaque fraction. Ainsi, on a déterminé la distribution en longueurs de chaînes dont le d.p. moyen est compris entre 20 et 60 résidus glucose (figure 52).

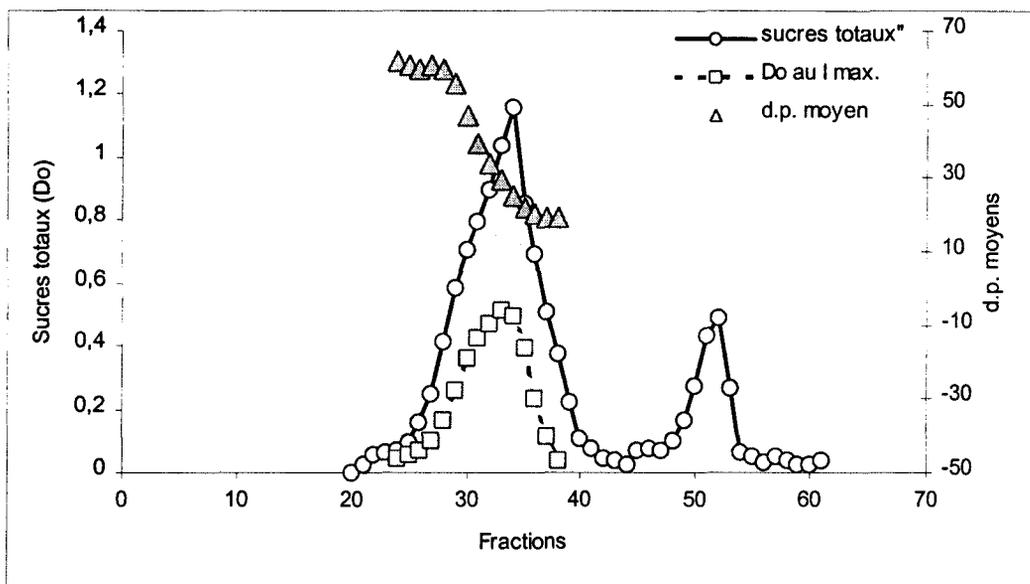


Figure 51 : Profil d'élution sur chromatographie TSK HW50 de l'hydrolysate de l'amylopectine. Sur chaque fraction de 3 ml est effectué le dosage des sucres totaux et un spectre entre 400 et 700 nm des complexes iode-polysaccharides ; à partir des λ max. obtenues sont déterminés les d.p. moyens des oligosaccharides dans chaque fraction

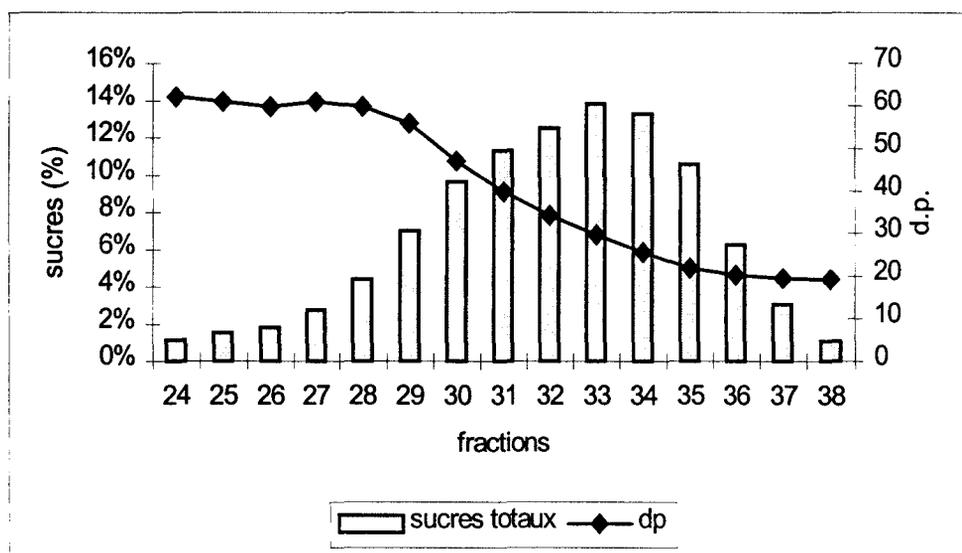


Figure 52 : Distribution en longueurs de chaînes de l'amylopectine de l'amidon floridéen. Les pourcentages sont obtenus par calcul des rapports des quantités des sucres totaux dans chaque fraction ; les d.p. moyens sont calculés selon la formule de Fales en utilisant les λ max. obtenues pour chaque fraction après séparation sur gel de filtration TSK HW50 de produit de la réaction isoamylosique

b - Chromatographie HPAE-PAD

L'hydrolysat isoamylasique dessalé par chromatographie de gel filtration TSK HW40, puis fractionné par chromatographie d'échange d'anions à pH élevé et à détection ampérométrique pulsée HPAE-PAD, donne un profil de distribution de longueurs de chaînes débranchées par l'isoamylase dont la longueur ne dépasse pas 20 résidus glucose (figure 53). Nous n'avons pas détecté d'oligosaccharides de taille inférieure ou égale à 4 résidus glucose par cette méthode. Dans la zone 6 à 15 résidus glucose, la distribution en longueurs de chaînes est comparable à celle obtenue par le fractionnement par électrophorèse (figure 54, B et C).

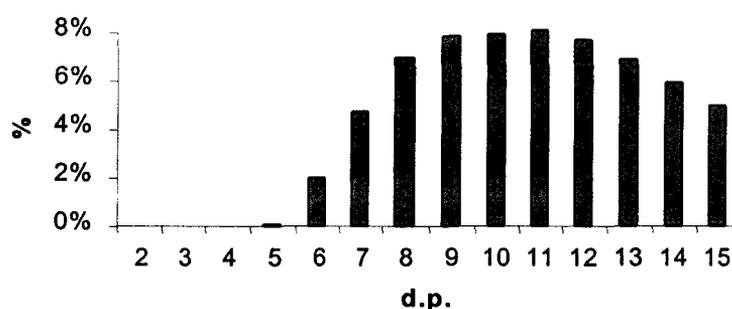


Figure 53 : Distribution de longueurs de chaînes, profil obtenu par séparation en HPAE-PAD d'un hydrolysat isoamylasique de l'amylopectine purifiée à partir de l'amidon floridéen de *R. violacea*

c- Electrophorèse après dérivatisation de glucanes

Les distributions en longueurs de chaîne obtenues par fractionnement en électrophorèse des glucanes issus d'une hydrolyse isoamylasique des amylopectines purifiées à partir de l'amidon floridéen de *R. violacea* cultivée en +N et -N sont présentées dans la figure 54 (B, C). La distribution en longueurs de chaîne obtenue dans les mêmes conditions sur l'amylopectine de *C. reinhardtii* BAFR1 est présentée dans la figure 54 (A). Les deux profils B et C ne présentent pas de différence majeure. Ces deux profils comparés au profil A de l'amylopectine témoin, montrent une différence au niveau des chaînes glucaniques de taille inférieure à 8 résidus glucose. En effet, dans les amylopectines de l'amidon floridéen, on a une distribution de chaînes de taille allant de 2 à 15 résidus glucose, alors que dans l'amylopectine témoin cette distribution commence à des tailles de 6 résidus glucose.

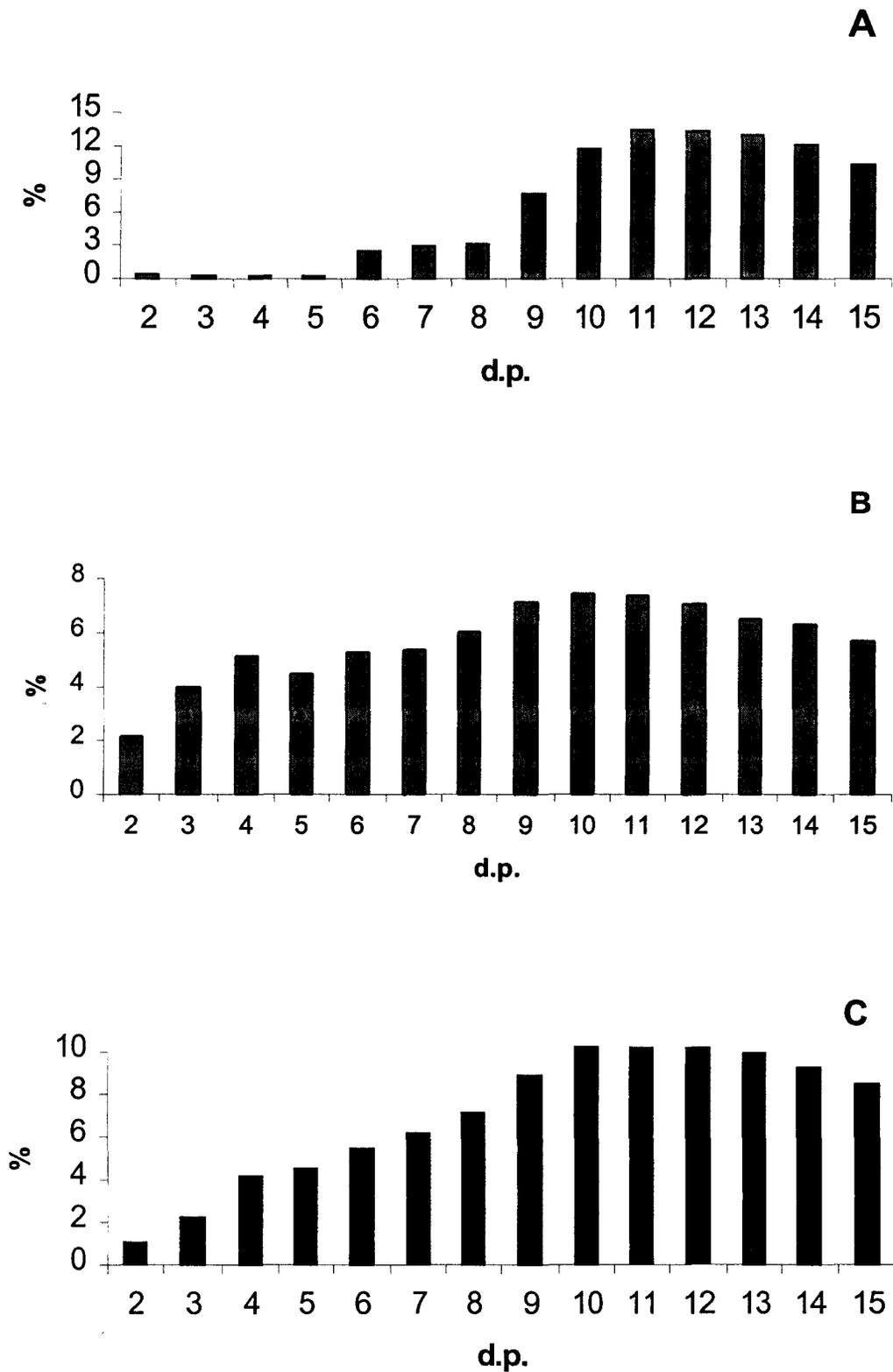


Figure 54 : Analyse par électrophorèse de la distribution en longueurs de chaînes, A : Amylopectine témoin , B : amylopectine de *R. violacea* cultivée en +N, C : Amylopectine de *R. violacea* cultivée en -N

D - Etude de la structure de l'amidon floridéen par diffraction aux rayons X

L'analyse de l'amidon floridéen par diffraction aux rayons X (réalisée en collaboration avec le Docteur A. BULEON à l'INRA de Nantes) a montré que celui-ci présente une structure majoritaire de type B. Ce type de cristallinité est rencontré chez les amidons des tubercules. Cette analyse a montré aussi la présence dans l'amidon floridéen d'une structure mineure de type A. Ce type de cristallinité est rencontré habituellement dans l'amidon des céréales.

E - Détermination des types de liaisons osidiques par méthylation

Cette étude est réalisée en collaboration avec Yves Leroy sous la responsabilité de Gérard Streker au sein de Laboratoire de Chimie Biologique dirigé par le Professeur André Verbert.

Des quantités d'amylopectine et d'amylose (2 mg) issus du fractionnement de l'amidon floridéen, subissent une méthylation puis une hydrolyse, une réduction et une acétylation. Les sucres méthylés et partiellement acétylés obtenus, sont séparés par chromatographie en phase gazeuse munie d'une colonne capillaire (BPX70, 30 m x 0.22 mm). Dans la figure 55 sont montrées les origines des perméthyles glucose. Le 2,3,4,6-Met-Glc correspond aux glucoses non réducteurs terminaux, le 2,3,6-Met-Glc aux glucoses liés en α -1,4 à l'intérieur des chaînes glucaniques (résidu majoritaire), le 2,6-Met-Glc au glucose lié en α -1,4 qui présente un branchement sur le carbone 3 (branchement de type glucanique ou sous forme d'une substitution par un groupement phosphate) et le 2,3-Met-Glc correspond au glucose lié en α -1,4 qui est substitué sur son carbone 6 (points de branchement).

figure 56 sont montrées les origines des perméthyles glucose. Le 2,3,4,6-Met-Glc correspond aux glucoses non réducteurs terminaux, le 2,3,6-Met-Glc aux glucoses liés en α -1,4 à l'intérieur des chaînes glucaniques (résidu majoritaire), le 2,6-Met-Glc au glucose lié en α -1,4 qui présente un branchement sur le carbone 3 (branchement de type glucanique ou sous forme d'une substitution par un groupement phosphate) et le 2,3-Met-Glc correspond au glucose lié en α -1,4 qui est substitué sur son carbone 6 (points de branchement).

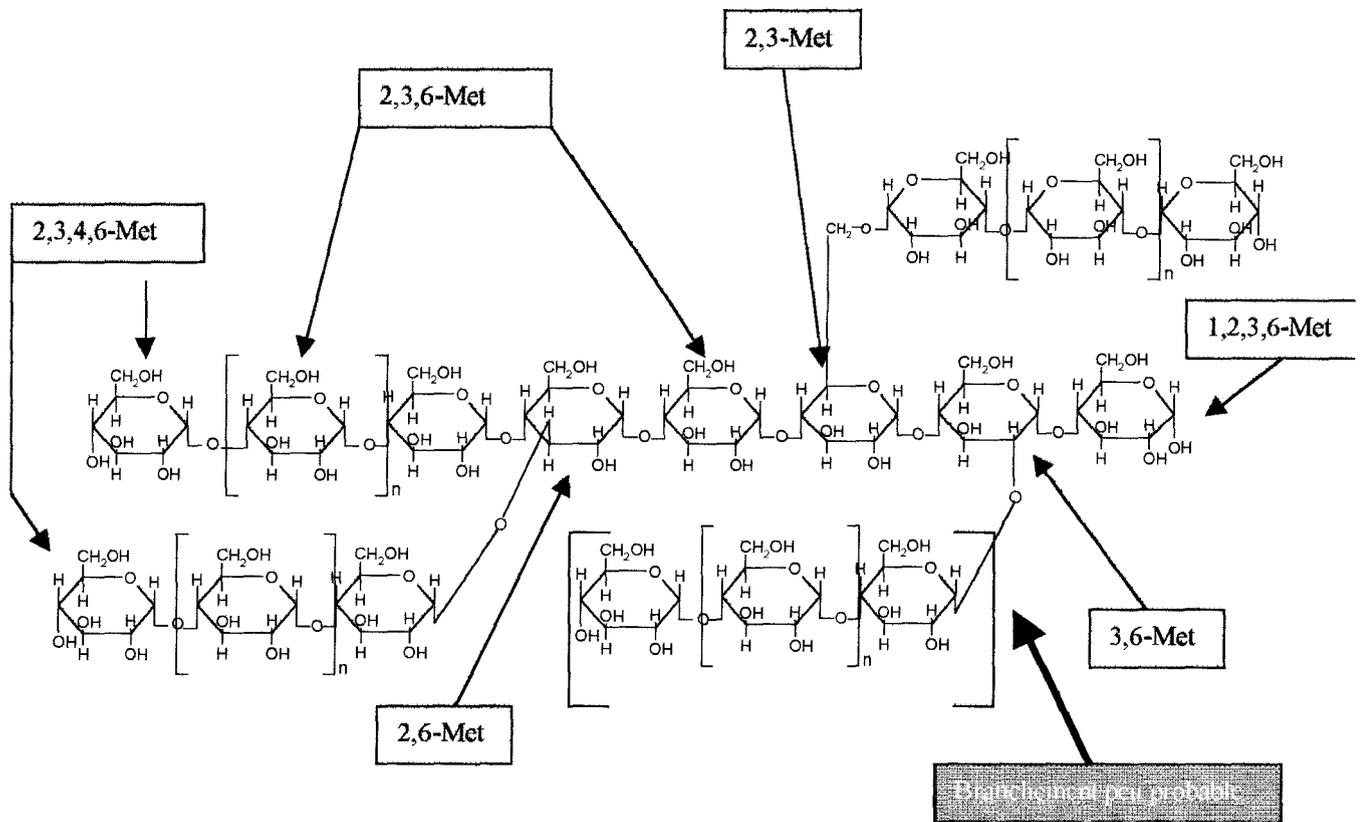


Figure 56 : Représentation des divers types de liaisons révélées par l'analyse des polysaccharides par méthylation et séparation par chromatographie en phase gaz

Le tableau 15 montre les pourcentages des différents perméthyles glucose issus de l'amylose, de l'amylopectine de l'amidon floridéen et de l'amylopectine témoin issue de maïs waxy.

d'amylose), nous avons trouvé 5,12% de 2,3-Met-Glc ce qui correspond aux valeurs citées dans la littérature. La mise en évidence du 2,6-Met-Glc dans l'amylose et l'amylopectine de l'amidon floridéen à des taux respectifs de 0,32 et 0,33%, correspondrait à la présence d'une ramification sur les chaînes glucaniques au niveau du carbone 3 du glucose lié en α -1,4. Dans la littérature, ce type de ramification a été observé dans l'amidon de maïs Waxy (Wolfrom et Thompson, 1956), et dans l'amidon floridéen extrait de *Dilsea edulis* (Peat et coll., 1959a). Ces taux de 0,32 et 0,33% sont très faibles et ne nous permettent pas d'affirmer l'existence de la liaison α -1,3 par cette méthode de méthylation. De même, pour la présence de la liaison α -1,2, les taux de 3,6-Met-Glc sont très faibles.

Pour l'amylose fractionné à partir de l'amidon floridéen, le perméthyle glucose (2,3,4,6-Met-Glc) correspondant au glucose terminal non réducteur représente 1,60%, et le 2,3-Met-Glc qui traduit les points de branchement en carbone C6 représente 1,33%. Ces deux faibles valeurs montrent que cet amylose possède une structure très peu ramifiée.

Tableau 15 : Pourcentage des glucoses méthylés séparés par CPG ; (1) issus du fractionnement de l'amidon floridéen de *R. violacea* cultivée dans un milieu pauvre en azote, (2) amylopectine commerciale issue du maïs Waxy

Polysaccharides	% Glucose Méthylé				
	2,3,4,6-Met	2,3,6-Met	2,6-Met	3,6-Met	2,3-Met
<i>Amylose</i> ¹	1,60	96,43	0,32	0,32	1,33
<i>Amylopectine</i> ¹	6,10	87,29	0,33	0,33	5,95
<i>Amylopectine</i> ²	5,32	88,61	0,54	0,41	5,12

F - Analyse par spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)

Les spectres obtenus en infrarouge sur les amylopectines de *R. violacea* cultivée dans les milieux ^{+}N (culture avec azote) et ^{-}N (culture sans azote) et sur l'amylopectine de *C. reinhardtii* souche «BAFR1, ne produisant pas d'amylose», sont présentés dans la figure 56. Ceux obtenus sur les amyloses de *R. violacea* cultivée dans les conditions ^{+}N et ^{-}N sont présentés dans la figure 57.

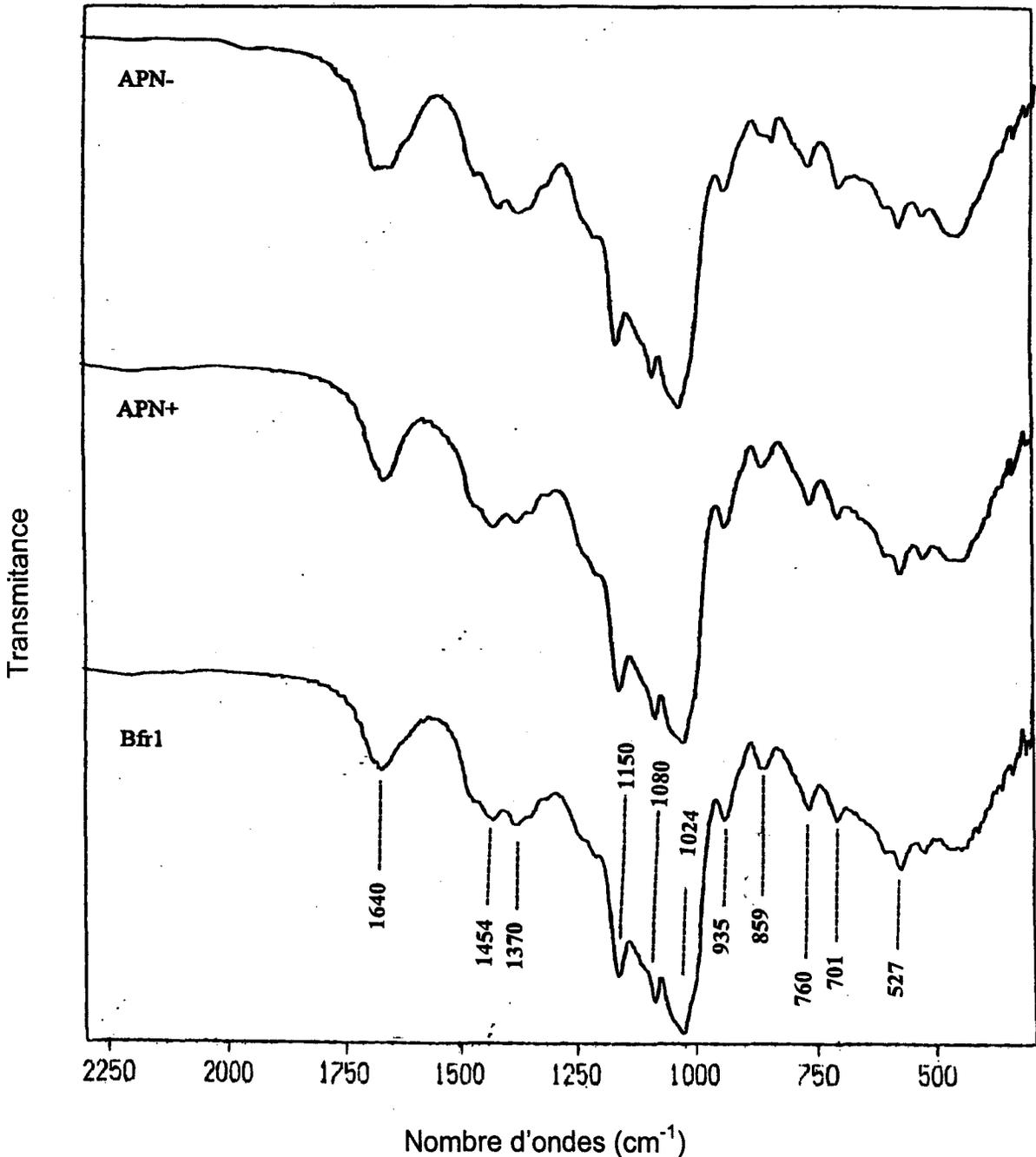


Figure 56: Spectres infrarouges de l'amylopectine issue de *R. violacea* cultivée dans des conditions avec azote APN+ et sans azote APN-, et de l'amylopectine de *Chlamydomonas* souche BAFR1

1 - Spectres IR-TF d'amylopectine

Les spectres obtenus, d'une part sur les deux amylopectines de *R. violacea* cultivée dans les milieux avec et sans azote ajouté et d'autre part sur celle de *C. reinhardtii* (BAFR1), ne présentent pas de différence significative (figure 56). Les profils de ces trois spectres sont équivalents aux spectres obtenus sur l'amidon et la dextrine de pomme de terre. La série des pics suivants se reproduit de façon constante dans les profils de ces cinq spectres : 527, 576, 760, 859, 935, 1024, 1080, 1150, 1200 (épaulement), 1350, 1410, 1454 et 1647 cm^{-1} . On distingue très nettement un pic vers 980 cm^{-1} et un épaulement vers 1050 cm^{-1} dans le spectre obtenu sur l'amidon et la dextrine de pomme de terre. Dans les trois spectres des amylopectines, nous observons des épaulements correspondant à ces nombres d'ondes.

Dans la région 700 à 1000 cm^{-1} : les bandes à 720 et 730 sont attribuées à la déformation de la liaison C-O-C (Sekkal, 1990) ; la bande à 859 cm^{-1} est attribuée au groupement sulfate lié sur le C4 en position axiale (Lloyd et coll., 1961 ; Turvey et coll., 1967) ; la bande à 935 cm^{-1} est attribuée aux vibrations des liaisons C-O-C (Stanley, 1963) ; les absorbances dans la région de 980 cm^{-1} , sont attribuées aux vibrations des liaisons P-O-C (Socrates, 1997).

Dans la région 1000 à 1200 cm^{-1} : l'allure des pics à 1024, 1080, 1150 et 1200 cm^{-1} est comparable à celle de l'amidon et à celle de la dextrine de pomme de terre. Un épaulement vers 1050 cm^{-1} est bien distingué ; les deux bandes d'absorption vers 980 et 1050 cm^{-1} traduisent la présence du groupement P-O-C (Socrates, 1997). Les vibrations à 1150 et 1200 cm^{-1} sont attribuées au groupements sulfonates dans les polysaccharides (Perlin et Casu, 1982).

Dans la région 1200 à 1700 cm^{-1} : l'allure de cette région des spectres issus des trois amylopectines est légèrement différente de celle observée dans les spectres de l'amidon et de la dextrine de pomme de terre. En effet, dans ces deux derniers, une bande d'absorption vers 1240 cm^{-1} est bien distincte sous forme de pic ; par contre dans les spectres des amylopectines, cette bande apparaît sous forme d'épaulement et elle est attribuée à la présence des groupements S=O (Perlin et Casu, 1982). Les pics à 1350, 1410, 1454 et 1650 cm^{-1} sont présents et bien distincts dans les cinq spectres. La présence des bandes d'absorption vers 1350 et 1150 cm^{-1} peut être attribuée à la présence de groupements P=O (Socrates, 1997) ; les bandes à 1454 et 1650 cm^{-1} sont attribuées à la présence des groupements carboxyliques sous leur forme sel (R-COO^-) (Perlin et Casu, 1982)

2 - Spectres IR-TF d'amylose

Les deux spectres obtenus sur les deux échantillons d'amylose de *R. violacea* cultivée dans les deux différentes conditions en azote (-N et +N), présentent, d'une part, des différences vis à vis des spectres des amylopectines, d'autre part, une différence entre eux. En effet, les bandes d'absorption communes aux deux spectres d'amylose sont 790, 860, (épaulement à 970 et 1050 cm^{-1}), 1080, 1150, (épaulement à 1220 cm^{-1}), et 1454 cm^{-1} . On retrouve donc les deux épaulements à 970 et 1050 cm^{-1} qui traduisent la présence de groupements P-O-C. La bande à 1350 cm^{-1} est intense dans le spectre de l'amylose «+N». Conjointement à cette bande dans ce même spectre, la présence de la bande à 1150 cm^{-1} suggère la présence de groupements P=O. A la différence du spectre de l'amylose «-N», celui de l'amylose «+N» présente toutes les bandes correspondantes à la présence des groupements phosphates (970, 1050 cm^{-1} pour P-O-C ; 1150, 1350 cm^{-1} pour P=O). De plus, il présente deux bandes fines et intenses à 700 et 835 cm^{-1} . Cette dernière bande est attribuée au groupement sulfate sur le carbone 3 du glucose (Turvey et coll., 1967 ; Spedding, 1957). Les deux bandes d'absorption dans la région 1400 et 1600 cm^{-1} correspondant aux groupements carboxyles, sont plus intenses dans le spectre de l'amylose «+N» que dans celui de l'amylose «-N».

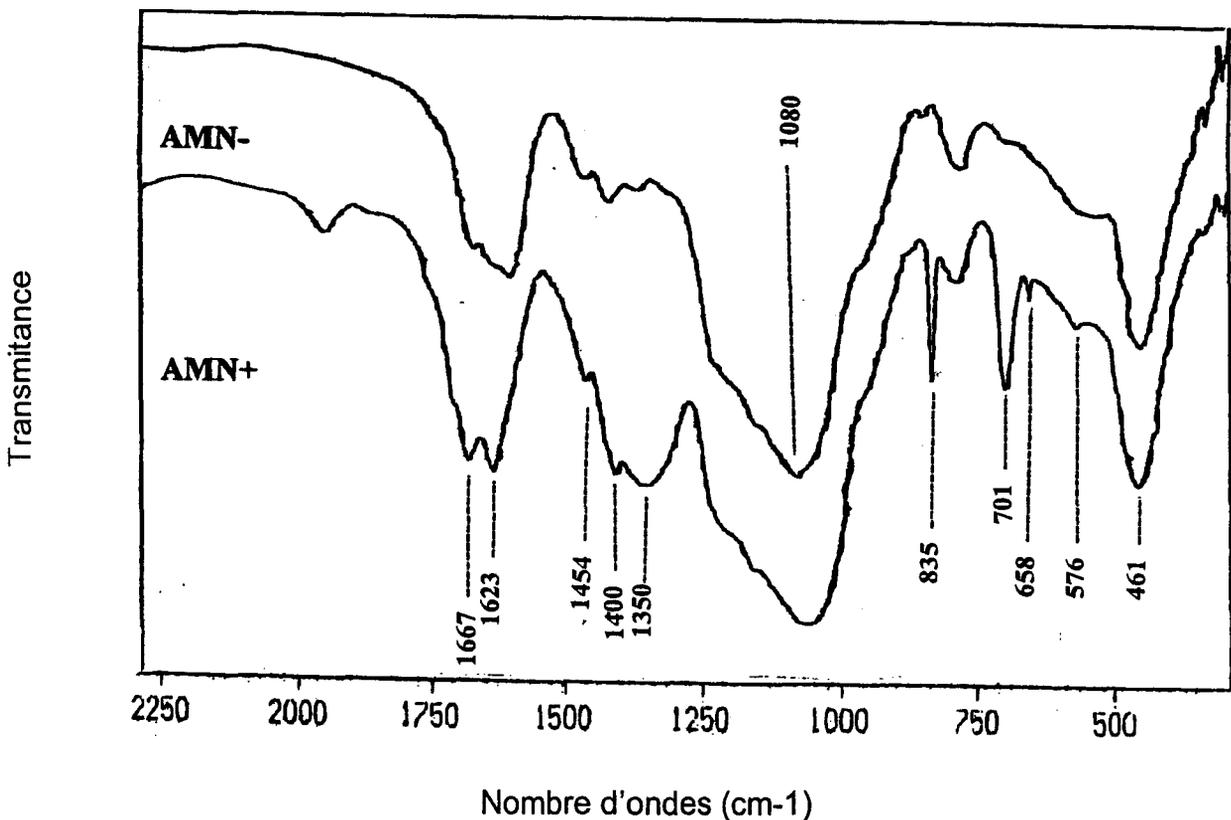


Figure 57 : Profils des spectres obtenus en IR-TF sur l'amylose issu des cultures enrichies (AMN+) et pauvres (AMN-) en azote

G - Etudes enzymatiques

1 - Mise en évidence de la protéine liée au grain par séparation sur gel d'électrophorèse

Sur de l'amidon floridéen fraîchement purifié sur percol, on effectue une extraction des protéines liées au grain dans des conditions dénaturantes (SDS, β -mercaptoéthanol). Leur séparation sur gel de polyacrylamide révèle la présence d'une bande de protéines majoritaires (figure 58), de poids moléculaire inférieur à 67 KDa. Cette protéine majeure chez *Chlamydomonas reinhardtii* (souche sauvage) possède une masse moléculaire de 76 Kda.

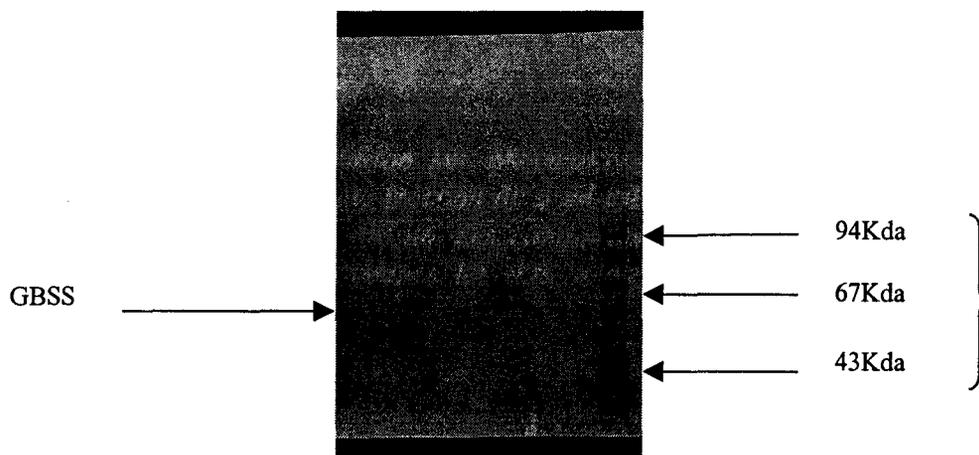


Figure 58 : Séparation et mise en évidence sur gel d'électrophorèse SDS de la protéine liée au grain d'amidon floridéen de R. violacea cultivée dans la condition non carencée en azote

2 - Recherche d'une activité GBSS

La GBSS est une enzyme nécessaire à la synthèse de l'amylose mais sa présence dans le grain d'amidon n'engendre pas systématiquement la présence d'amylose. Elle est de loin la protéine majeure du grain d'amidon (Preiss, 1991). Chez *C. reinhardtii*, elle incorpore de l'ADP-Glucose sur des séquences amorces de glucose. Chez les Rhodophyta, elle est très peu étudiée. A notre connaissance, un seul article a fait état de la présence de la GBSS chez une Rhodophyta. En effet, Nagashima et collaborateurs (1971) ont montré l'activité α -1,4-glucan, α -1,4-glucosyltransferase chez *Serraticardia maxima*, dans deux fractions, l'une contenant de l'amidon floridéen plus

des fragments de chloroplastes et l'autre contenant exclusivement de l'amidon floridéen. Dans ces deux fractions, ils ont montré que les nucléotides sucres étaient transférés préférentiellement dans l'ordre suivant : ADP-Glc>UDP-Glc>GDP-Glc. Yu (1992) n'a pas détecté d'activité amidon floridéen synthétase chez une souche de *Gracilaria sp.* en utilisant l'ADP-Glc et l'UDP-Glc comme substrats donneurs de glucose.

Pour notre part, nous avons utilisé comme source de glucose deux nucléotides sucres l'ADP-Glucose et l'UDP-Glucose. Après deux heures d'activité, nous avons calculé selon la formule de linéarisation de Lineweaver-Burk (figure 59), les constantes de Michaelis (K_m) et les vitesses maximales (V_m) de la GBSS vis-à-vis de ces deux substrats. Nous avons obtenu pour l'ADP-Glucose un K_m de 43 mM et une V_m de 7,38 mM/min.µg d'amidon et pour l'UDP-Glucose un K_m de 31 mM et une V_m de 2,98 mM/min.µg d'amidon. La GBSS de la souche sauvage de *C. reinhardtii* possède un K_m de 4 mM pour l'ADP-Glc (Delrue et coll., 1992).

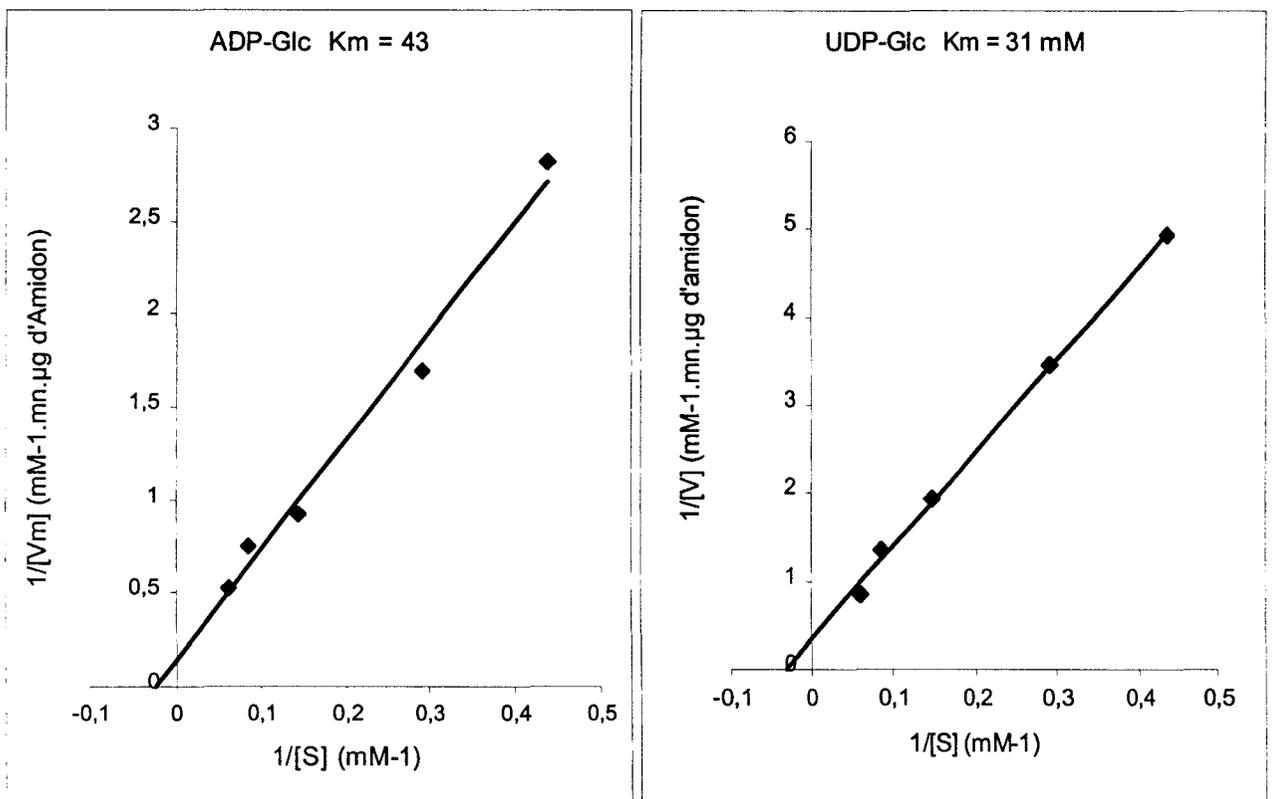


Figure 59 : Représentation en double inverse, selon Lineweaver-Burk, des cinétiques de réactions de la GBSS vis à vis des deux nucléotides sucre (ADP-Glc et UDP-Glc) dans le grain d'amidon

H - L'amidon floridéen chez d'autres Rhodophyta

1 - Chez *Porphyridium cruentum* Näegeli

Le *Porphyridium cruentum* (Näegeli) est une Rhodophyta unicellulaire de la classe des Bangiophyceae, de l'ordre des Porphyridiales et de la famille des Porphyridiaceae, de taille allant de 4 et 9 μm de diamètre. Sur le plan évolutif, le *P. cruentum* se trouve en bas de l'arbre phylogénétique des algues rouges (annexe 9).

Le profil de fractionnement sur CL2B de l'amidon floridéen extrait du *P. cruentum* (figure 61) montre l'absence de la fraction qui correspond à l'amylose. La λ max. du complexe iode-polysaccharides de la fraction correspondant à l'amylopectine est de 538 nm ; il est équivalent au maximum d'absorption du complexe iode-amidon avant fractionnement qui est également de 538 nm. Cela montre que cet amidon floridéen est dépourvu d'amylose. Néanmoins, l'augmentation de la λ max. au voisinage de la fraction 120, témoigne de la présence d'un complexe iode-polysaccharides dont l'intensité d'absorption est négligeable.

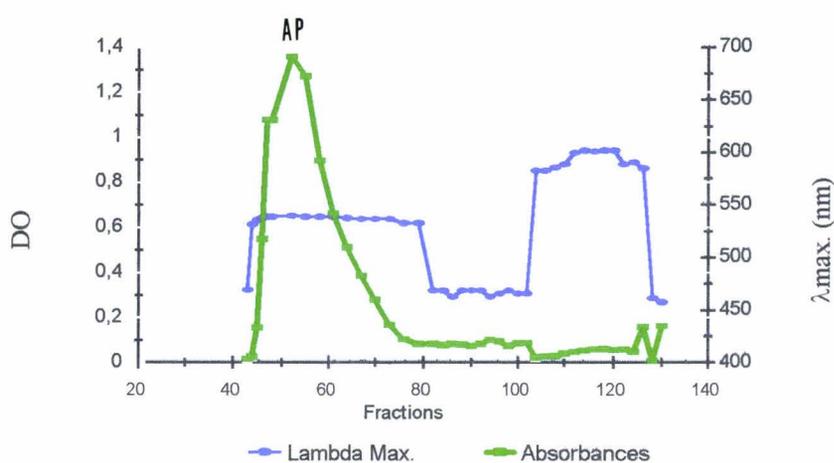


Figure 61 : Profil de fractionnement sur gel filtration (CL2B) de l'amidon floridéen extrait à partir de *Porphyridium cruentum* (un spectre du complexe iode-polysaccharides est réalisé entre 400 et 700 nm pour chaque fraction de 3ml, la densité optique est enregistrée au pic du maximum d'absorption -ou λ max.-). La fraction exclue correspond à l'amylopectine. Au voisinage de la fraction 120, on observe une légère apparition du complexe iode-polysaccharides qui témoigne de la présence d'amylose même en très faible quantité

Le taux de branchement calculé à partir du spectre RMN de l'amylopectine de *P. cruentum* (figure 62) est de 3,6%.

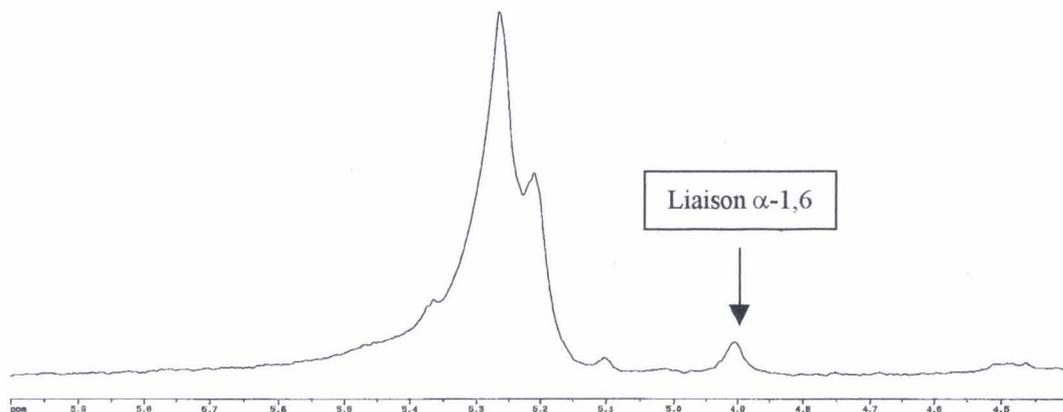


Figure 62 : Spectre RMN du ^1H de l'amylopectine de *Porphyridium cruentum*

2 - Chez *Gracilaria gracilis*

De la même manière que chez le *Porphyridium*, aucune fraction correspondant à l'amylose n'est détectée par fractionnement d'amidon floridéen de *Gracilaria gracilis* sur colonne CL2B (figure 63). Le maximum d'absorption du complexe Iode-polysaccharides contenu dans la fraction amylopectique est bas. Il se situe à 515 nm ; de plus, il est équivalent à celui de l'amidon avant fractionnement sur colonne égal à 516 nm, ce qui montre là encore l'absence d'amylose dans cet amidon floridéen.

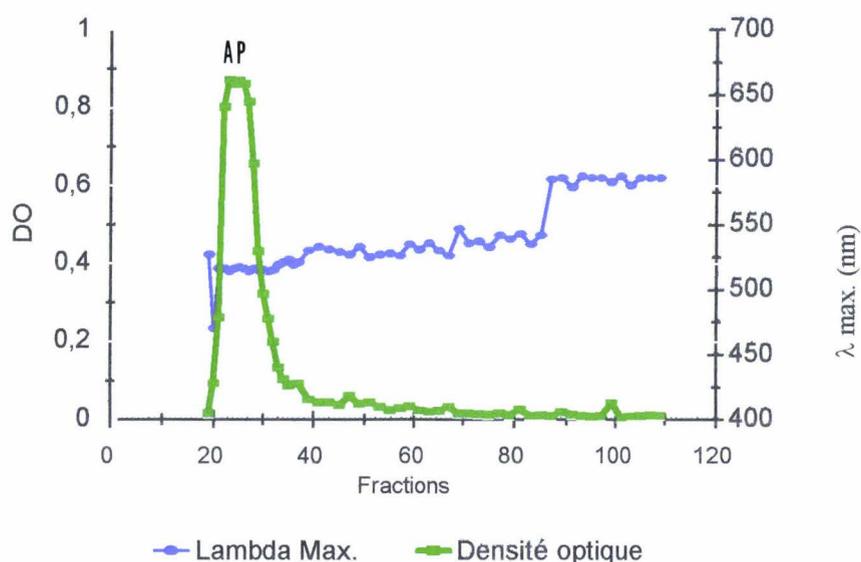


Figure 63 : Profil d'éluion de l'amidon issu de *Gracilaria gracilis* (un spectre du complexe iode-polysaccharides est réalisé entre 400 et 700 nm pour chaque fraction de 3 ml, la densité optique est enregistrée au pic du maximum d'absorption -ou λ max.-). La fraction exclue correspondant à l'amylopectine est unique dans ce cas

L'étude de branchement par RMN du proton (figure 63) de l'amylopectine de *Gracilaria gracilis* donne un résultat de 3,07%.

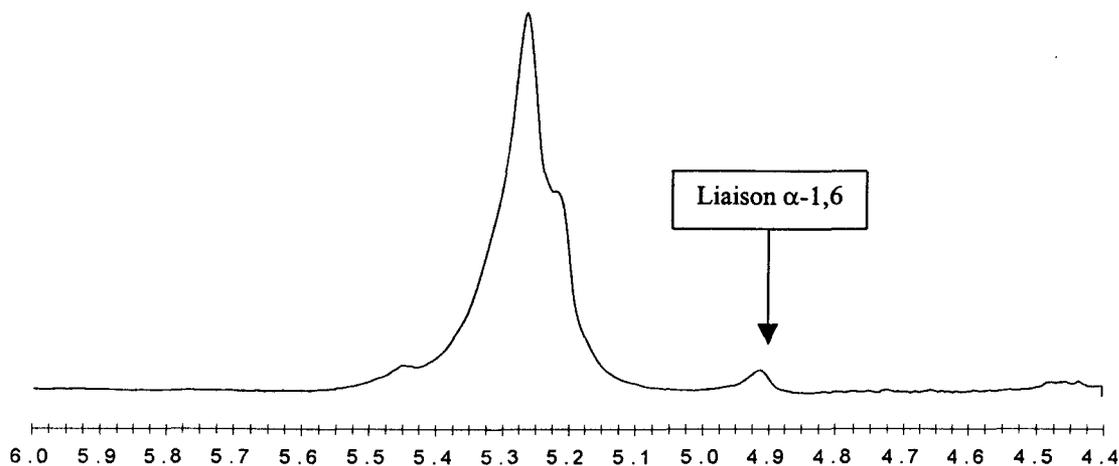


Figure 63 : Spectre RMN du ^1H du proton de l'amylopectine de *Gracilaria gracilis*

V - DISCUSSION

L'absence d'amylose dans l'amidon floridéen a été rapportée par de nombreux auteurs (Peat et coll., 1959b ; Gaillard et Bailey, 1966 ; Nagashima et coll., 1968 ; Sheath et coll., 1981a ; Chopin et coll., 1991 ; Van den Hoek et coll., 1996). Cette absence d'amylose lui a valu le nom de floridéen glycogène (Terence, 1985). Manners et Wright (1962) lui ont attribué une structure de type amylopectine plutôt que glycogène.

Les seuls travaux qui contredisent l'absence de l'amylose chez l'amidon des Rhodophyta, ont été publiés par McCracken et Cain en 1978 et notamment, en 1981 lorsqu'ils ont mis en évidence l'amylose dans l'amidon floridéen chez 8 espèces d'algues rouges. Pour ce faire, ces derniers ont utilisé des méthodes que l'on qualifierait à l'heure actuelle d'insuffisantes, pour caractériser ces deux polymères, en l'occurrence, la précipitation sélective au n-butanol pour séparer l'amylose et l'amylopectine, et l'utilisation des propriétés spectrales du complexe iode-polysaccharides (λ_{max}) ainsi qu'une β -amylolyse pour la caractérisation. Pour affirmer ou infirmer l'existence de l'amylose dans l'amidon des Rhodophyta, nous avons procédé à des techniques couramment utilisées pour étudier l'amidon d'une algue verte unicellulaire (*C. reinhardtii*). Nos résultats ont apporté la preuve que tous les amidons floridéens ne sont pas dépourvus d'amylose ; sur ce point, nous sommes en accord

avec les observations de McCracken et Cain (1978, 1981). Par contre, ces auteurs ont trouvé 10% d'amylose dans l'amidon floridéen chez *Porphyridium aerugineum* cultivé dans des conditions non carencées en azote, alors que nous le détectons seulement à l'état de traces chez *P. cruentum*, microalgue de même ordre que *Porphyridium aerugineum*. Dans l'amidon floridéen de *Gracilaria gracilis*, nous ne détectons pas la présence d'amylose. A la date de nos travaux, nous n'avons pas retrouvé dans la littérature d'études utilisant les méthodes physiques telles que la RMN, la diffraction aux rayons X, l'infrarouge à transformée de Fourier, pour caractériser l'amidon floridéen et ses constituants majoritaires, l'amylose et l'amylopectine. Nous ne pouvons pas confirmer la présence de branchement en position 3 de glucose des chaînes B ou C de l'amylopectine, malgré la détection du 2,6-méthylglucose dans l'analyse par méthylation de cette amylopectine ainsi que l'observation dans son spectre RMN du proton, d'un pic de très faible intensité vers 5,32 ppm, qui a été attribué par McIntyre et collaborateurs (1991) au proton anomérique de la liaison α -1,3 dans un dextran. Ce type de liaison (α 1-3) a été décrit dans l'amidon floridéen par Peat et Turvey (1959a, 1959b) et Meeuse et collaborateurs (1960), et dans l'amidon waxy par Wolfrom et Tompson (1956). La cinétique de débranchement de l'amylopectine de l'amidon floridéen par l'isoamylase est comparable à celle obtenue sur l'amylopectine de l'amidon de *C. reinhardtii*. La longueur moyenne des chaînes de l'amylopectine chez différentes espèces algales varie de 12 à 18 résidus glucose selon les différents auteurs (tableau 12). Pour notre part, nous avons trouvé une distribution en longueur de chaînes pour l'amylopectine de *Rhodella violacea* allant de 2 à 55 résidus glucose.

L'analyse en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier nous a permis la mise en évidence de la présence de groupements phosphates et sulfates ; il serait donc possible de doser ces groupements par cette méthode qui est, à l'heure actuelle, utilisée pour le dosage des sulfates dans d'autres polysaccharides tels que phycocoloïdes.

Sur le plan enzymatique, nos résultats sont préliminaires ; néanmoins, nous avons mis en évidence par l'extraction et la séparation sur gel d'électrophorèse, la protéine liée au grain, qui correspondrait à la GBSS. Le K_m de cette enzyme vis-à-vis des nucléotides sucre, l'ADP-glc et l'UDP-glc, est élevé.

VI - CONCLUSION

Les techniques de purification de l'amidon et de son fractionnement en amylose et amylopectine pour étudier l'amidon d'une microalgue verte d'eau douce (*Chlamydomonas reinhardtii*), nous ont permis l'isolement, la purification et le fractionnement de l'amidon floridéen ainsi que la quantification de ses deux composants majoritaires, l'amylose et l'amylopectine. On a montré que cet amidon floridéen chez *R. violacea* contient de l'amylose dont la proportion peut atteindre 30%, qu'il possède une structure cristalline de type B et qu'il contient une protéine liée au grain de poids moléculaire inférieur à 67 KDa. Son amylopectine possède un taux de branchement d'environ 3,6% et une distribution en longueur de chaînes entre 2 à 55 résidus glucose. L'amidon floridéen purifié à partir de *P. cruentum* et de *G. gracilis* contient de l'amylose à l'état de traces. Le taux de branchement de l'amylopectine déterminé par l'analyse en RMN du proton, nous a donné des valeurs (~3,6%) largement inférieures à celles obtenues par l'analyse par méthylation (~5,95%). Nous avons montré une distribution assez large en taille de chaînes dans l'amylopectine. En ce qui concerne l'amylose, son analyse par RMN du proton et par méthylation a montré qu'il s'agit d'un glucane non branché ; son analyse par IRTF a montré une différence selon que la culture l'algue dont il est issu est supplémentée ou non en azote.

CONCLUSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons mis en évidence quelques réponses physiologiques de *R. violacea* aux variations de la concentration en azote du milieu, aux variations de la température de culture et à l'exposition des cellules aux fortes intensités de la lumière. Nous avons obtenu un verdissement des cellules ainsi qu'une baisse de leur croissance lorsqu'elles sont soumises à une carence azotée. Cette carence provoque en même temps une augmentation de la production des exopolysaccharides et des polysaccharides de réserve. La température optimale de culture est de 20°C. Lorsque les cellules sont cultivées à des températures de 10 et 30°C, pour maintenir leurs processus physiologiques, elles adaptent la composition de leurs acides gras membranaires pour conserver une fluidité des membranes favorable à ces processus. Ainsi, quand les cellules sont cultivées à 10 °C, elles augmentent la proportion de leurs acides gras membranaires saturés, alors que lorsqu'elles sont cultivées à 30°C, elles augmentent la proportion des acides gras insaturés. La réponse des cellules cultivées à 10, 20 ou 30°C à un stress lumineux, montre que les cellules cultivées à 10 °C sont les plus sensibles à ce type de stress ; les cellules cultivées à 30°C développent une résistance supérieure à celle des cellules cultivées à la température optimale (20°C). Cela nous montre que l'adaptation des cellules à une température élevée leur permet aussi de résister à un stress lumineux. Dans la nature, l'augmentation de l'intensité lumineuse est accompagnée d'une élévation de la température ; le fait que l'adaptation à ces deux facteurs soit associée n'est donc pas surprenant.

L'analyse des exopolysaccharides produits par *R. violacea* a montré une grande similitude des structures primaires des polysaccharides solubles dans le milieu de culture et des polysaccharides capsulaires. Le polysaccharide soluble est un hétéropolymère sulfaté, constitué majoritairement de xylose et contenant de l'acide glucuronique. L'étude par spectroscopie IR-TF des complexes ions métalliques-polysaccharides a permis d'évaluer l'affinité spécifique de ces ions aux groupements carboxyliques et sulfates de ces polysaccharides. Cette affinité peut être classée dans l'ordre suivant : $\text{Cr}^{6+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cr}^{3+} > \text{Ni}^{2+}$. Le dosage par SEA-CIP des métaux captés par les polysaccharides a montré la capacité de rétention de ces polysaccharides vis à vis de différents ions classés dans l'ordre suivant : $\text{Mn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cr}^{3+} > \text{Cr}^{6+}$.

Nous avons extrait, purifié et fractionné l'amidon floridéen en amylose et amylopectine. L'analyse en RMN ^1H de ces deux fractions a montré que l'amylose ne possède pas de branchement détectable par cette méthode et que l'amylopectine possède un taux de branchement d'environ 3,6%. L'analyse par méthylation de ces deux fractions a montré un taux de branchement d'environ 1,33 % dans l'amylose et d'environ 5,95% dans l'amylopectine. L'utilisation de ces deux méthodes n'a pas permis de révéler la présence d'une liaison α -1,3 ; mais cette hypothèse n'est pas définitivement écartée. Les longueurs de chaînes dans l'amylopectine montrent une grande diversité ; elles varient de 2 à 55 résidus glucose.

L'étude par diffraction aux rayons X a révélé que l'amidon floridéen de *R. violacea* possède une structure majoritaire de type B cristallin et une présence mineure de type A. Le grain d'amidon floridéen extrait de *R. violacea* cultivée dans les conditions normales contient une protéine de poids moléculaire inférieur à 67 kDa.

Nous avons extrait et purifié l'amidon floridéen de deux autres espèces d'algues rouges, l'une unicellulaire, *P. cruentum*, l'autre macrophyte, *G. gracilis*. Chez la première, une quantité négligeable d'amylose est détectée alors que la deuxième en est complètement dépourvue. L'amylopectine de ces deux espèces possède un taux de branchement respectif de 3,6 et de 3,07 % obtenus par mesure en RMN du proton.

L'étude par IR-TF ne montre pas de différence entre l'amylopectine de *R. violacea* et celle de *C. reinhardtii* BFR1. Par contre, elle met en évidence une différence, chez *R. violacea*, entre l'amylose de obtenu dans des conditions de carence azotée et celui obtenu dans des conditions normales de culture.

La maîtrise de la culture de *R. violacea* dans les conditions de laboratoire permet d'envisager l'étude de l'influence d'autres paramètres environnementaux tels que la température, l'intensité de la lumière et sa qualité spectrale sur la production polysaccharidique. L'acquisition des techniques d'analyses chimiques et structurales permet l'étude de la structure des exopolysaccharides. Il est indispensable de fractionner des EPS acides et neutres sur résine échangeuse d'ions pour pouvoir étudier leurs propriétés biologiques (relation structure activité).

Les méthodes de dosage par SEA-CPI et par IR-TF des métaux fixés par les polysaccharides, permettent d'établir une cinétique de libération des ions par les EPS au cours des dialyses, et mettre en évidence le synergisme, l'antagonisme ou une éventuelle compétition entre divers ions métalliques.

La mise en évidence de l'amylose dans l'amidon floridéen d'autres algues Rhodophytes, la purification de la GBSS et son expression optimale *in vitro* sont des objectifs logiques pour achever une partie de notre travail.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Aghajanian J.G.** (1979) A starch grain-mitochondrion-dictyosome association in *Batrachospermum* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, **15** : 230-232
- Andrew J.Y.** (1991) The protective role of carotenoids in higher plants. *Physiol. Plantarum*, **83** : 635-643
- Arad S.M.** (1987) Production of sulfated polysaccharides from red unicellular algae. In : *Algal Biotechnology*, T. Stadler, J. Mollion, M.C. Verdus, Y. Karamanos, H. Morvan & D. Christiaen (Eds). Elsevier Appl. Sci., London, pp. 65-87
- Arad S.M., Lerental Y.B. and Dubinsky O.** (1992) Effect of nitrate and sulfate starvation on polysaccharide formation in *Rhodella reticulata*. *Bioresource Technol.*, **42** : 141-148
- Arad S.M., Keristovesky G., Simon B., Barak Z. and Geresh S.** (1993) Biodegradation of the sulphated polysaccharide of *Porphyridium* by soil bacteria. *Phytochemistry*, **32** (2) : 287-290
- Araki C.** (1958) Seweed polysaccharides. *Proc IVth Int. Biochem. Congr.*, **1** : 1-16
- Armond P.A., Schreiber U. and Bjöckman O.** (1978) Photosynthetic acclimation to temperature in the desert shrub, *Larrea devaricata* II. Light-harvesting efficiency and electron transport. *Plant Physiol.*, **61** : 411-415
- Arnott S., Fulmer A., Scott W.E., Dea J.C., Moorhouse R. and Rees D.A.** (1974) The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J. Mol. Biol.*, **90** : 268-284
- Ayehunie S., Belay A., Hu Y., Baba T.W. and Ruprecht R.M.** (1996) Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthospira palatensis*). *J. Phycol.*, **8** : 440
- Ball S., Marianne T., Dirick L., Fresnoy M., Delrue B. and Deck A.** (1991) A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta*, **185** : 17-26
- Ball S., Guan H.P., James M., Myers A., Keeling P., Mouille G., Buléons A. Colonna P. and Preiss J** (1996) From Glycogen to Amylopectin a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell.*, **86** : 349-352
- Balloni W., Florenzano G., Materassi R., Tredici M., Soeder C.J., Wagener K.** (1982) Mass cultures of algae for energy forming in coastal deserts. In : *Energy from biomass*, 2nd E.C. Conference, Strub A., Chartier P., Schleser G. (Eds.), Berlin, pp. 291-295

- Banks W., Greenwood C.T. and Khan K.M.** (1971) The interaction of linear amylose oligomers with iodine. *Carbohydr. Res.*, **17** : 25-33
- Banks W. and Greenwood C.T.** (1975). Fractionation of the starch granule and the fine structure of its components. *In* : *Starch and its components*, Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 5-66
- Barber J. and Andersson B.** (1992) Too much of good thing : light can be bad for photosynthesis. *TIBS*, **17** : 61-66
- Barclay W.R. and Lewin R.** (1985) Microalgal polysaccharide production for the conditioning of agricultural soils. *Plant Soil.*, **88** : 159-169
- Barclay W.R., Meager K.M. and Abril J.R.** (1994) Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J. Appl. Phycol.*, **6** : 123-129
- Becker E.W.** (1994). *In* : *Microalgae*, Cambridge University Press, 293 p.
- Ben Amotz A. and Avron M.** (1980) Glycerol, β -carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of *Dunaliella*. *In* : *Algae biomass, production and use*, Shelef G. and Soeder C.J. (Eds). Elsevier Appl. Sci., London and N.Y., pp. 603-610
- Berry J. and Björkman O.** (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Phys.*, **31** : 491-543
- Blankeney A.B. and Stone B.A.** (1985) Methylation of carbohydrates with lithium methylsulfonyl carbanion. *Carbohydr. Res.*, **140** : 319-324
- Blanshard J.** (1987) Starch granule structure and fonction : a physicochemical approach. *In* : *Starch : properties and potential*, T. Galliard, J. Miley and S. Michester (Eds.). ? ? ? ? ? pp. 16-54
- Blumenkratz N. and Asboe-Hansen G.** (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, **54** : 484-489
- Bonin D.J.** (1983) Les microalgues. Extrait de *Biomasse Actualités*, numéro spécial **3** : 22-23
- Bororad L.** (1975) Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Annu. Rev. Plant Phys.*, **26** : 369-401
- Borowitzka M.A.** (1978) Plastid development and floridéen starch grain formation during carposporogenesis in the coralline red alga *Lithothrix aspergillum* Gray. *Protoplasma*, **95** : 217-228
- Borowitzka M.A.** (1988a) Vitamins and fine chemicals. *In* : *Micro-algal Biotechnology*, Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp.15-26

- Borowitzka M.A.** (1988b) Fats, oils and hydrocarbons. *In* : *Micro-algal Biotechnology*, Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 257-287
- Borowitzka M.A.** (1988c) Microalgae as sources of essential fatty acids. *Aust. J. Biotechnol.*, **1** : 58-62
- Borowitzka M.A.** (1995) Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Appl. Phycol.*, **7** : 3-15
- Braud J.P.** (1992) Les divers modes de culture d'algues pour l'obtention de molécules d'intérêt économique. *Océanis*, **18**, fasc 2 : 141-149
- Braud J.P., Chaumont D., Gudin C., Thépenier C., Chassin P. et Lemaire C.** (?). Microalgues productrices de polysaccharides exocellulaires. *Colloque Valva*, R. Delepine, J. Gaillard, Ph. Morand (Eds). CNRS/IFREMER Publ. Fr., pp. 85-86
- Briantais J.M., Dacosta J., Goulas Y., Ducruet J.M. and Moya I.** (1996) Heat stress induces in leaves an increase of the minimum level of chlorophyll fluorescence, F_0 : a time-resolved analysis. *Photosynth. Res.*, **48** : 189-196
- Bukhov N.G., Sabat S. and Mohanty P.** (1990) Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplasts. *Photosynth. Res.*, **23** : 81-87
- Callegari J.P.** (1989) Feu vert pour les microalgues. *Biofutur*, **Février** : 25-38
- Callow M.E. and Evans L.V.** (1974) Studies on the synthesis and secretion of mucilage in the unicellular red alga *Rhodella*. *In* : *Proceedings of the eighth international seaweed symposium.*, G.E. Fogg and W. Eifion Jones (Eds). The Marine Science Laboratories, Menai Bridge, pp. 154-158
- Casadevall E., Dif D., Largeau C., Gudin C., Chaumont D., Desanti O.** (1985) Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*. Hydrocarbon production in relation to physiological state, cell structure and phosphate nutrition. *Biotechnol. Bioeng.*, **27** : 286-295
- Chaumont D., Thepenier C., Gudin C. and Junjas C.** (1987) Scaling up a tubular photoreactor for continuous culture of *Porphyridium cruentum* from laboratory to pilot plant (1981-1987). *In* : *Algal Biotechnology*, T. Stadler, J. Mollion, M.C. Verdus, Y. Karamanos, H. Morvan & D. Christiaen (Eds). Elsevier Appl. Sci., London, pp. 199-208
- Chopin T., Haniskm D. and Koehn F.E.** (1991) Effects of seawater phosphorus concentration on floridean starch content in *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft et Wynne (Rhodophyceae). *Bot. Mar.*, **34** : 369-373.
- Cohen E., Koren A. and Arad S.M.** (1991) A closed system for outdoor cultivation of microalgae. *Biomass and Bioenergy*, **1** (2) : 83-88
- Cohen Z. and Cohen S.** (1991) Preparation of eicosapentaenoic acid (EPA) concentrate from *Porphyridium cruentum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68** : 16-19

- Craigie J.S.** (1974) Storage products. *In* : *Algal Physiology and Biochemistry*, W.D.P. Stewart (Ed.), Blackwells, Oxford, pp. 206-235
- Deby C.** (1988) Metabolism of polyunsaturated fatty acids. *In* : *Precursors of Eicosanoids*, P.B. Curtis-Pior (Ed.). Churchill Livingstone, London, pp. 11-36
- Delphin E., Duval J.C., Etienne A.L. and Kirilovsky D.** (1996) State transitions or Δ pH-dependent quenching of photosystem II fluorescence in red algae. *Biochemistry*, **35** : 9435-9445
- Delrue B., Fontaine T., Routier F., Deck A., Wieruszeski J.M., Van den Koornhuysse N., Maddelein M.L., Fournet B. and Ball S.** (1992) Waxy *Chlamydomonas reinhardtii* : monocellular alga mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J. Bacteriol.*, **174** : 3612-3620
- Dubinsky O., Simon B., Karamanos Y., Geresh S., Barak Z. and Arad S.M.** (1992) Composition of the cell wall polysaccharide produced by the unicellular red alga *Rhodella reticulata*. *Plant Physiol. Biochem.*, **30** (4) : 409-414
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F.** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28** : 350-356
- Ducruet J.M. and Lemoine Y.** (1985) Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine-resistant biotypes from different plant species. *Plant Cell Physiol.*, **26** (3) : 419-429
- Evans L.V., Callow M.E., Percival E. and Fareed V.** (1974) Studies on the synthesis and composition of extracellular mucilage in the unicellular red alga *Rhodella*. *J. Cell Sci.*, **16** : 1-21
- Fales F.W. Frank.W.** (1980) The linear relationship between iodine staining and average chain length of the unbranched amyloglucans. *The Biopolymers*, **19** : 1535-1542
- Falk S., Samuelsson G., Öquist G.** (1990) Temperature dependent photoinhibition and recovery of photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* acclimated to 12 et 27°C. *Physiol. Plantarum.*, **78** : 173-180
- Fareed V.S. and Percival E.** (1974) Extracellular mucilage from *Rhodella Maculata*. *In* : *Proceedings of the eighth international seaweed symposium.*, G.E. Fogg and W. Eifion Jones (Eds). The Marine Science Laboratories, Menal Bridge, pp. 548-551
- Fareed V.S. and Percival E.** (1976) The presence of rhamnose and 3-0-methylxylose in the extracellular mucilage from the red alga *Rhodella maculata*. *Carbohydr. Res.*, **53** : 276-277

- Fontaine T., D'Hust C., Maddelein M.L., Routier F., Marianne-Pépin T., Deck A., Wieruszeski J.M., Delrue B., Van den Koornhuysse N., Bossu J.P., Fournet B. and Ball S.** (1993) Towards an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J. Biol. Chem.*, **268** : 16223-16230
- Fredrick J.F.** (1967) Glucosyltransferase isoenzymes in algae. *Phytochemistry*, **6** : 1041-1046
- Fresnel J. et Billard C.** (1987) Contribution à la connaissance du genre *Rhodella* (Porphyridiales, Rhodophyceae). *Cryptogamie Algol.*, **8** (1) : 49-60
- Gaillard B.D.E. and Bailey R.W.** (1966) Reaction with iodine of polysaccharides dissolved in strong calcium chloride solution. *Nature*, **212** : 202-203
- Galliard T.** (1983) Starch lipid complexes and another non-starch components of starch granules in cereal grains. In : *Mobilization of reserves in germination*, Nozzolillo R., Lea P.J., Loewus F.A. (Eds). Plenum Press, New York, pp. 111-136
- Gantt E. and Conti S.F.** (1965) The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *J. Cell. Biol.*, **26** : 365-375
- Gantt E., Edwards M.R., Conti S.F.** (1968) Ultrastructure of *Porphyridium aerugineum*. A blue-green colored rhodophytan. *J. Phycol.*, **4** : 65-71
- Gantt E.** (1990) Pigmentation and photoacclimation. In : *Biology of the Red Algae*, Cole K.M. and Sheath R.G. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 203-220
- Geresh S., Dubinsky O., Arad S.M., Christiaen D.** (1990) Structure of 3-O-(α -D-glucopyranosyluronic acid)-L-galactopyranose, an aldobiouronic acid isolated from the polysaccharides of various unicellular red algae. *Carbohydr. Res.*, **208** : 301-305
- Geresh S. and Arad S.M.** (1991) The extracellular polysaccharides of the red microalgae : chemistry and rheology. *Bioresource Technol.*, **38** : 195-201
- Geresh S., Arad S.M. and Shefer A.** (1997) Chemically crosslinked polysaccharide of the red microalga *Rhodella reticulata* - an ion exchanger for toxic ions. *J. Carbohydr. Chem.*, **16** : 703-708
- Gerwick W.H., Roberts M.A., Proteau P.J. and Chen J.L.** (1994) Screening cultured marine microalgae for anticancer-type activity. *J. Appl. Phycol.*, **6** : 143-149
- Glazer A.N.** (1994) Phycobiliproteins – a family of valuable, widely used fluorophores. *J. Appl. Phycol.*, **6** : 105-112
- Greenwood C.T. and Thompson J.** (1961) Physicochemical studies on starch. XXIII. Physical properties of floridean starch and the characterization of structure-type of branched α -1,4-glucans. *J. Chem. Soc.*, LE TOME : 1534-1537

Gudin C and Thepenier C. (1986) Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *In* : *Adv. in Biotechnol. Processes*, Mizrahi A. & Liss A.R. (Eds), vol. 6 : 73-110

Gudin C. (1987) Why bother with microalgae ?. *In* : *Algal Biotechnology*, T. Stadler, J. Mollion, M.C. Verdus, Y. Karamanos, H. Morvan & D. Christiaen (Eds). Elsevier Appl. Sci., London, pp. 33-40

Gudin C. (1989) Les microalgues en France et en Europe. *Biofutur*, Février : 39-40

Gustafson E.M., Cardellina J.H., Fuller R.W., Weislow O.S., Kiser R.F., Snder K.M., Patterson K.M.L., Boyd M.R. (1989) AIDES-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). *J. Natl. Cancer I.*, 81 : 1254-1258

Haglund K., Björklund M., Gunnare S., Sandberg A. Olander U. and Pedersen M. (1996) New method for toxicity assessment in marine and brackish environments using the macroalga *Gracilaria tenuistipitata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 326/327 : 317-325

Hakomori S. I. (1964) A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharides catalysed by methysulfonyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.*, 2 : 205-208

Harris G.P. and Piccinin B.B. (1987) *In* : *Tropics in photosynthesis, Photoinhibition*, Kyle D.J., Osmond C.B. and Arntzen C.J. (Eds). Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, vol. 9, 255 p.

Harris P.O. and Ramelow G.J. (1990) Binding of metal ions by particulate biomass derived from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. *Environ. Sci. Technol.*, 24 : 220-228

Havaux M. and Gruszecki W.I. (1993) Heat- and light-induced chlorophyll a fluorescence changes in potato leaves containing high or low levels of the carotenoid zeaxanthin : indication of a regulatory effect of zeaxanthin on thylakoid membrane fluidity. *Photochem. Photobiol.*, 58 : 607-614

Havaux M. and Tardy F. (1995) Short-term adaptive responses of photosynthesis to elevated temperatures and strong light. *In* : *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, P. Mathis (Ed.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, vol. IV : 777-782

Havaux M. and Tardy F. (1996) Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem II in vivo : possible involvement of xanthophyll-cycle pigments. *Planta*, 198 : 324-333

Henley W.J., Levavasseur G., Franklin L.A., Osmond R. and Ramus J. (1991) Photoacclimation and photoinhibition in *Ulva rotundata* as influenced by nitrogen availability. *Planta*, 184 : 235-243

Herbreteau F., Coiffard L.J.M., Derien A. and De Roeck-Holtzhauer Y. (1997) The fatty acid composition of five species of macroalgae. *Bot. Mar.*, 40 : 25-27

Hovenkamp-Hermelink J.H.M., Jacobsen E., Ponstein A.S., Visser R.G.F., Vos-Scheperkeuter G.H., Bijmolt E.W., de Vries J.N., Witholt B. and Feenstra W.J. (1987) Isolation of amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **75** : 217-221

Ilik P., Naus J., Cikanek D. and Novotny R. (1995) Chlorophyll fluorescence changes at high temperatures induced by linear heating of greening barley leaves. *Photosynth. Res.*, **44** : 271-275

Jahn W., Steinbiss J. and Zetsche K. (1984) Light intensity adaptation of phycobiliprotein content of the red alga *Porphyridium*. *Planta*, **161** : 536-539

Jaseja M. and Perlin A.S. (1989) N.m.r. structure determination of 3-O-(α -D-glucopyranosyluronic acid)-L-galactopyranose, an aldobiouronic acid isolated from the unicellular red alga *Rhodella reticulata*. *Carbohydr. Res.*, **186** : 313-319

Jensen A. (1993) Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiologia*, **260/261** : 15-23

John D.M. (1994) Biodiversity and conservation : an algal perspective. *The Phycologist*, **38** : 3-15

Jones R.F., Speer H.L., Kury W. (1963) Studies on the growth of the red alga *Porphyridium cruentum*. *Physiol. Plantarum*. **16** : 636-643

Kaplan D., Christiaen D. and Arad S.M. (1987) Binding of heavy metals by algal polysaccharides. In: *Algal Biotechnology*, T. Stadler, J. Mollion, M.C. Verdu, Y. Karamanos, H. Morvan & D. Christiaen (Eds.). Elsevier Appl. Sci., London, pp. 179-187

Karamanos Y., Ondarza M., Bellanger F., Christiaen D. and Moreau S. (1989) The linkage of 4-O-methyl-L-galactopyranose in the agar polymers from *Gracilaria verrucosa*. *Carbohydrate Research*, **187** : 93-101

Kawachi M., Kato M., Ikemoto H. and Miyachi S. (1996) Fatty acid composition of a new marine picoplankton species of the Chromophyta. *J. Appl. Phycol.*, **8** : 397-401

Kellam S.J. and Walker J.M. (1989) Antibacterial activity from marine microalgae. *Br. Phycol. J.*, **24** : 191-194

Khan A., Swalaha F.M. and Kassar H.C. (1996) An investigation of the metal biosorptive potential of algae. *J. Appl. Phycol.*, **8** : 449

Khozin I., Adlerstein D., Bigongo C., Heimer Y.M. and Cohen Z. (1997) Elucidation of the Biosynthesis of Eicosapentaenoic acid in the microalga *Porphyridium cruentum*. II. Studies with radiolabeled precursors. *Plant Physiol.*, **114** : 223-230

Kiefer S. (1987) In: *Tropics in photosynthesis, Photoinhibition*, Kyle D.J., Osmond C.B. and Arntzen C.J. (Eds). Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, vol. **9**, 255 p.

Kieras J.H. and Chapman D.J. (1976a) Structural studies on the extracellular polysaccharide of the red alga, *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr. Res.*, **52** : 169-177

- Kieras J.H., Kieras F.J. and Bowen D.V.** (1976b) 2-O-methyl-D-glucuronic acid, a new hexuronic acid of biological origin. *Biochem. J.*, **155** : 181-185
- Kieras J.H., Roden L. and Chapman D.J.** (1977) The covalent linkage of protein to carbohydrate in the extracellular protein-polysaccharide from the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biochem. J.*, **165** : 1-9
- Kitano M., Matasukawa R. and Krube I.** (1998) Enhanced eicosapentaenoic acid production by *Navicula saprophila*. *J. Appl. Phycol.*, **10** : 101-105
- Kornmann P.** (1965) *Porphyridium violaceum*, eine marine neue Art. *Helgolander Meeresun.*, **12** : 420-423
- Krause G.H. and Behrend U.** (1986) Δ pH-dependent chlorophyll fluorescence quenching indicating a mechanism of protection against photoinhibition of chloroplasts. *FEBS Lett.*, **200** : 298-302
- Kroen W.K. and Ramus J.** (1990) Viscous polysaccharide and starch synthesis in *Rhodella reticulata* (Porphyridiales, Rhodophyta). *J. Phycol.*, **29** : 266-271
- Kützing F.T.** (1843) *Phycologia Generalis*. Leipzig, 40
- Leavitt R.I.** (1983) Process for the preparation of L-proline by cultivation algae. U.S. Patent 4, 383038
- Lee R.E.** (1974) Chloroplast structure and starch grain production as phylogenetic indicators in the lower Rhodophyceae. *Br Phycol. J.*, **9** : 291-295
- Lee R.E.** (1989) *Phycology*. Lee R.E. (Ed.), Cambridge University Press, New York, 645 p.
- Lee Y.K.** (1997) Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J. Appl. Phycol.*, **9** : 403-411
- Libessart N., Maddelein M.L. Van den Koornhuysse N., Decq A., Delrue B., Mouille G., D'hulst C. and Ball S.** (1995) Storage, Photosynthesis, and Growth: The conditional nature of mutation affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas*. *Plant Cell.*, **7** : 1117-1127
- Libessart, N.** (1996) Photosynthèse et mise en réserve : un compromis difficile entre la structure et la fonction du grain d'amidon. Thèse, Sciences de la Vie et de la Santé, Lille, 160 p.
- Lin H.L., Sommerfeld M.R., and Swafford J.R.** (1975) Light and electron microscope observations on motile cells of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, **11** : 452-457
- Lineback, D.R.** (1984) The starch granule organization and properties. *Bakers Digest*, pp. 17-21.

- Lloyd A.G., Dodgson K.S., Price R.G. and Rose F.A.** (1961) Infrared studies on sulfate ester. I. Polysaccharide sulfates. *Biochim. Biophys. Acta.*, **46** : 108-115
- Loaëc M., Olier R. and Guerenec J.** (1997) Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Res.*, **31** (5) : 1171-1179
- Lupescu N., Solo-Kwan J., Christiaen D., Morvan H. and Arad S.M.** (1992) Structural determination by means of gas chromatography-mass spectrometry of 3-O-(α -D-glucopyranosyluronic acid)-galactopyranose, an aldobiuronic acid derived from *Porphyridium* sp. polysaccharide. *Carbohydr. Polym.*, **19** : 131-134
- Mabeau S., Vallat O. and Brault D.** (1990a) Le charme discret des macro-algues. De l'Orient à l'Occident : les principaux marchés. *Biofutur*, mars : 24-29
- Mabeau S., Vallat O. and Rochas C.** (1990b) Le charme discret des macro-algues. De nouveaux débouchés : nouveaux ou potentiels. *Biofutur*, mars : 30-35
- Maddelein M.L., Libessart N., Bellanger F., Delrue B., D'Hulst C., Van den Koornhuysse N., Fontaine T., Wieruszkeski J.M., Decq A. and Ball S.** (1994) Towards an understanding of the biogenesis of the starch granule. *J. Biol. Chem.*, **269** (40) : 25150-25157
- Mahan C.A., Majidi V. and Holcombe J.A.** (1989) Evaluation of the metal uptake of several algae strains in a multicomponent matrix utilizing inductively coupled plasma emission spectrometry. *Anal. Chem.*, **61** : 624-627
- Manners D.J. and Wright A.** (1962) α -1,4-glucosans. XIV. The interaction of concanavalin-A with glycogens. *J. Chem. Soc.* : 4592-4595
- Manners D.J.** (1989) Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydr. Polym.*, **11** : 87-112
- Mass F.M., Hoffmann I., Van Harmelen M.J. and De Kok L.J.** (1986) Refractometric determination of sulfate and other anions in plant separated by high-performance liquid chromatography. *Plant Soil*, **91** : 129-132
- McCracken D.A. and Cain J.R.** (1978) The occurrence of amylose in primitive member of the Rhodophyta. *J. Phycol.*, **15** : 20
- McCracken D.A. and Cain J.R.** (1981) Amylose in floridean starch. *New Phytol.*, **88** : 67-71
- McIntyre D.D. and Vogel H.J.** (1991) Nuclear magnetic resonance studies of homopolysaccharides related to starch. *Starch-Stärke*, **43** : 69-76
- Medcalf D.G., Scott J.R., Brannon J.H., Hemerick G.A., Cinningham R.L., Chessen J.H. and Shah J.** (1976) Some structural features and viscometric properties of the extracellular polysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr. Res.*, **44** : 87-96
- Meeuse B.J.D., Andries M. and Wood J.A.** (1960) Floridean Starch. *J. Exp. Bot.*, **11** : 129-140

Mendoza H., Jiménez del Rio M., Garcia Reina G. and Ramazanov Z. (1996) Low-temperature-induced β -carotene and fatty acid synthesis, and ultrastructural reorganization of the chloroplast in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, **31** : 329-331

Metzger P. and Casadevall E. (1983) Structure de 3 nouveaux botryococcènes synthétisés par une souche de *Botryococcus braunii* cultivée en laboratoire. *Tetrahedron Lett.*, **24** : 4013-4020

Miller G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, **31** : 426-428

Molina Grima E., Robles Medina A., Giménez Giménez A. and Ibanez Gonzales M.J. (1996) Gram-scale purification of eicosapentaenoic acid (EPA, 20 : 5n-3) from wet *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass. *J. Appl. Phycol.*, **8** : 359-367

Mollet J.C., Rahaoui A., Lemoine Y. (1998) Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria* cf. *vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). *J. Appl. Phycol.*, **10** : 59-66

Moore R.E., Patterson M.L. and Carmichael W.W. (1988) New pharmaceuticals from cultured blue-green algae. In : *Biomedical Importance of Marine Organisms*, Fautin D.G. (Ed.). California Academy of Sciences, San Francisco, pp. 143-150

Morrison W.R. and Milligan T.P. (1982) Lipids in maize starch. In : *Maize : recent progress in chemistry and technology*, Inglett G.E. (Ed.). Academic Press, New York., pp. 1-18

Morrison W.R. and Laignelet B. (1983) An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *J. Cereal Sci.*, **1** : 9-20

Morrison W.R. and Karkaras J. (1990) Starch Methods in Plant Biochemistry. P.M. Dey (Ed.), Academic Press Limited, San Diego, **2** : 323-352,

Mouille G. (1997) L'épissage de glucanes : une étape majeure de la biosynthèse de l'amylopectine. Thèse, Sciences de la Vie et de la Santé, Lille, 114 p.

Nagashima H., Nakamura S. and Nisizawa K. (1968) Biosynthesis of floridean starch by chloroplast preparations from a marine red alga *Serraticardia maxima*. *Bot. Mag.* (Tokyo), **81** : 411-413

Nagashima H., Ozaki H., Nakamura S. and Nisizawa K. (1969) Physiological studies on floridean starch, floridoside and trehalose in a red alga, *Serraticardia maxima*. *Bot. Mag.* (Tokyo), **82** : 462-473

Nagashima H., Nakamura S., Nisizawa K. and Hori T. (1971) Enzymic synthesis of floridean starch in a red alga, *Serraticardia maxima*. *Plant Cell Physiol.*, **12** : 243-253

- Nelson O.E. and Rines H.W.** (1962) The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, **9** : 297-300
- Nisizawa K., Noda H., Kikuchi R. and Watanabe T.** (1987) The marine seaweed food in Japan. *Hydrobiologia*, **151/152** : 5-29
- Nitsan Z., Mokady S. and Sukenik A.** (1998) Modification of table egg adding *Nannochloropsis* biomass to diet. *J Appl. Phycol.*, **8** : p. 451
- O'Shea M.G. and Morell M.K.** (1996) High resolution slab gel electrophoresis of 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid (ATPS) tagged oligosaccharides using a DNA sequencer. *Electrophoresis*, **17** : 681-688
- Ohta S., Chang T., Aozasa O., Ikegami N. and Miyata H.** (1993) Alterations in fatty acid composition of marine red alga *Porphyridium purpureum* by environmental factors. *Bot. Mar.*, **36** : 103-107
- Oswald W.J.** (1988) Microalgal and waste-water treatment. *In* : *Micro-algal Biotechnology*, Borowitzka M.A. and Borowitzka L.J. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 305-328
- Otero A., Garcia D., and Fabregas J.** (1997) Factors controlling eicosapentanoic acid production in semicontinuous cultures of microalgae. *J. Appl. Phycol.*, **9** : 465-469
- Ozaki H., Maeda M. and Nisizawa K.** (1967) Floridean starch of a calcareous red alga, *Joculator maximus*. *J. Biochem. - Tokyo*, **61** : 497-503
- Patrone L.M., Broadwater S.T. and Scott J.L.** (1991) Ultrastructure of vegetative and dividing cells of the unicellular red algae *Rhodella violacea* and *Rhodella maculata*. *J. Phycol.*, **27** : 742-753
- Patterson G.M.L., Baldwin C.L., Bolis C.M., Caplan F.R., Karuso H., Larsen L.K., Levine I.A., Moore R.E., Nelson C.S., Tschappat K.D., Tuang G.D., Furusawa E., Furusawa S., Norton T.R. and Raybourne R.B.** (1991) Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). *J. Phycol.*, **27** : 530-536
- Paulsen B.S. and Vieira A.A.H.** (1994) Structure of the capsular and extracellular polysaccharides produced by the desmid *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, **30** : 638-641
- Peat S., Turvey J.R. and Evans J.M.** (1959a) The structure of floridean starch. Part I. Linkage analysis by partial acid hydrolysis. *J. Chem. Soc.* : 3223-3227
- Peat S., Turvey J.R. and Evans J.M.** (1959b) The structure of floridean starch. Part II. Enzymic hydrolysis and other studies. *J. Chem. Soc.* : 3341-3344
- Percival E. and Foyle R.AJ.** (1979) The extracellular polysaccharides of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aerugineum*. *Carbohydr. Res.*, **72**: 165-176
- Perlin A.S. and Casu B.**(1982) Spectroscopy methods. *In* : *The Polysaccharides*, Aspinall G. O. (Ed). Academic Press, London, **1** : 133-186

- Preiss J. and Boyer C.** (1980) Evidence for independent genetic control of the multiple forms of maize endosperm branching enzymes and starch synthases. *In* : *Mechanisms of saccharide polymerization and depolymerization*, Marschall J.J. (Ed.). Academic Press, New York, pp. 161-174
- Preiss J.** (1991) Starch : biosynthesis and its regulation. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, 7 : 59-114
- Provasoli L.** (1968) Media and prospects of cultivation of marine algae. *In* : *Culture of collection algae*. Watanabe A. and A. Hattori (Eds). Proc. U.S. – Japon Conf., Hakone. *Jpn. Soc. Plant Physiol.*, 63-75
- Qiang H., Zhengyu H., Cohen Z. and Richmond A.** (1997) Enhancement of eicosapentaenoic acid (EPA) and γ -linolenic acid (GLA) production by manipulating algal density of outdoor cultures of *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta) and *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *Eur. J. Phycol.*, 32 : 81-86
- Radmer R.J. and Parker B.C.** (1994) Commercial application of algae : Opportunities and constraints. *J. Phycol.*, 6 : 93-98
- Radmer R.J.** (1996) Algal diversity and commercial algal products. *Bioscience*, 46: 263-270
- Ramus J.** (1972) The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium aeruginum*. *J. Phycol.*, 8 : 97-111
- Ramus J.** (1973) Cell surface polysaccharide of the red alga *Porphyridium*. *In* : *Biogenesis of plant cell wall polysaccharides*, Loewus F. (Ed.). Academic Press, New York, pp. 333-359
- Ramus J.** (1986) Rhodophytes unicells : biopolymers, physiology and production. *In* : *Algal Biomass Technology*, W.R. Barclay, & R.P. McIntosh (Eds). J. Cramer, Berlin, Germany, pp. 52-57
- Rees D.A.** (1969) Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.*, 24 : 267-332
- Rotem A., Merchuk J.C. and Arad S.M.** (1992) Inhibition of the growth of the red microalga *Porphyridium sp.* by limitation of nutrient transfer. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 55 : 263-267
- Running J.A., Huss R.J. and Olson P.T.** (1994) Heterotrophic production of ascorbic acid by microalgae. *J. Phycol.*, 6 : 99-104
- Sautier C.** (1995) La page économique d'Algorythme. Algorythme, Ceva, Ifremer
- Schreiber U. and Armond P.A.** (1978) Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and related heat damage at the pigment level. *Biochim. Biophys. Acta.*, 502 : 138-151

Schreiber U. and Berry J.A. (1977) Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. *Planta*, **136** : 233-238

Sekkal M. (1990) Utilisation conjointe de la spectrométrie IRTF et de la modélisation moléculaire à l'étude structurale des carraghenanes. Thèse de Spectrochimie, Lille, 162 p.

Sheath R.G., Hellebust J.A. and Takashi S. (1979a) Floridean starch metabolism of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta). I. Changes during ageing of batch culture. *Phycologia*, **18** (2) : 149-163

Sheath R.G., Hellebust J.A. and Takashi S. (1979b) Floridean starch metabolism of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta). II. Changes during the cell cycle. *Phycologia*, **18** (3) : 185-190

Sheath R.G., Hellebust J.A. and Takashi S. (1981a) Ultrastructure of floridean starch granule. *Phycologia*, **20** (3) : 292-297

Sheath R.G., Hellebust J.A. and Takashi S. (1981b) Floridean starch metabolism of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta). III. Effect of darkness and metabolic inhibitors. *Phycologia*, **20** (1) : 22-31

Shiran D., Khozin I., Heimer Y.M. and Cohen Z. (1996) Biosynthesis of eicosapentaenoic acid in the microalga *Porphyridium cruentum*. I. The use of externally supplied fatty acids. *Lipids*, **31** (12) : 1277-1282

Slonecker J.H. (1972) Gas liquid chromatography of alditol acetates. *Meth. Carbohydr. Res. Chem.*, **6** : 20-24

Smith A.M., Bettley M. and Bedford I.D. (1989) Evidence that the *rb* locus alters the starch content of developing pea embryos through an effect on ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.*, **89** : 1279-1284

Socrates G. (1997) Infrared characteristic group frequencies, Tables and charts. G. Socrates (Ed.), J. Wiley & Sons, Toronto, 250 p.

South J.B., Morrison W.R. and Nelso O.E. (1991) A relationship between the amylose and lipids contents of starches from various mutants for amylose content in maize. *J. Cereal Sci.*, **14** : 267

Spedding H. (1957) Infrared spectroscopy and carbohydrate chemistry. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **12** : 23-49

Stanley N.F. (1963) Process for treating a polysaccharide of seaweeds of the Gartinaceae and Solariaceae family. U. S. Patent 3094517

Stark D.A., Timmerman K.P., Barry G.F., Preiss J. and Kishore G.M. (1992) Role of ADP-glucose pyrophosphorylase in regulating starch levels in plant tissues. *Science*, **57** : 1-8

- Steup M.** (1990). Starch degrading enzymes. *In* : *Methods in plant biochemistry*, **3** : 103-129
- Stevenson T.T. and Furneaux R.H.** (1991) Chemical methods for the analysis of sulfated galactans from red algae. *Carbohydr. Res.*, **210** : 277-298
- Terence J.P.** (1985) Algal polysaccharides. *In* : *The polysaccharides*. Aspinall G. O. (Ed). **3** : 165-285
- Thorn W. and Mohazzeb S.** (1990) α -D-polyglucan-iodine complexes. *Starch-Stärke*, **42** : 455-459
- Torzillo G., Pushparaj B., Bocci F., Balloni W., Materassi R. and Florenzano G.** (1986) Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. *Biomass*, **11** : 75-79
- Tsai C.Y. and Nelson O.E.** (1966) Starch deficient mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Science*, **151** : 341-343
- Tsekos I.** (1982) Plastid development and floridean starch grain formation during carposporogenesis in the red algae *Gigartina teedii*. *Cryptogamie Algol.*, **2** : 91-103
- Turvey J.R. and Simpson P.R.** (1966) Polysaccharides from *Corallina officinalis*. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **5** : 323-327
- Turvey J.R., Bowker D.M. and Harris M.J.** (1967) Infrared spectra of carbohydrate sulphates. *Chemistry and Industry*, 2081-2082
- Ucko M., Geresh S., Simon-Berkovitch B.S., Arad S.M.** (1994) Predation by a dinoflagellate on a red microalga with a cell wall modified by sulfate and nitrate starvation. *Mar. Ecol.- Prog. Ser.*, **104** : 293-298
- Van den Hoek C., Mann D.G. and Jahns H.M.** (1996) Rhodophyta (red algae). *In* : *Algae : An introduction to phycology*, Van Den Hoek C., Mann D.G. & Jahns H.M. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, 623 p.
- Van den Koornhuise N., Libessart N., Delrue B., Zabawinski C., Decq A., Iglesias A., Preiss J. and Ball S.G.** (1996) Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.*, **271** : 16281-16287
- Vonshak A., Torzillo G. and Tomaseli L.** (1994) Use of chlorophyll fluorescence to estimate the effect of photoinhibition in outdoor cultures of *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.*, **6** : 31-34
- Wehrmeyer W. und Scheider H.** (1975) Elektronenmikroskopische untersuchungen zur reversiblen veränderung der chloroplastenfeinstruktur von *Rhodella violacea* bei stickstoffmangel). *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **168** : 519-532
- Whyte J.N.C.** (1971) Polysaccharides of the red seaweed *Rhodomenia pertusa*. I. Water soluble glucan. *Carbohydr. Res.*, **16** : 220-204

- Wolfrom M.L. and Thompson A.** (1956) Occurrence of the (1→3)-linkage in starches. *J. Am. Chem. Soc.*, **78** : 4116-4117
- Yamamoto H.Y., Nakayama T. and Chichester C.** (1962) Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97** : 168-173
- Yamane Y., Kashino Y., Koike H. and Satoh K.** (1995) Effects of high temperatures on photosynthetic systems in higher plants. In : *Photosynthesis from light to biosphere*, Matis P. (Ed). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, the Netherlands, vol **IV** : 849-852
- Yamane Y., Kashino Y., Koike H. and Satoh K.** (1997) Increases in the fluorescence F_0 level and reversible inhibition of photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants. *Photosynth. Res.*, **52** : 57-64
- Yongmanitchai W., Ward O.P.** (1989) Omega-3 fatty acids : alternative sources of production. *Process Biochem.*, **24** : 117-124
- Yu S.** (1992) Enzymes of floridean starch and floridoside degradation in red algae. Thesis of University of Stokholm – Sweden, 136 p.

ANNEXES

ANNEXE 1

Composition d'Eau de Mer Artificielle (EMA) (Jones and coll., 1963)

NaCl	27,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	6,6 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5,6 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,5 g
KNO ₃	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,07 g
NaHCO ₃	0,04 g

1 ml de la solution mère de fer

1 ml de la solution mère des microéléments

2,5 ml de la solution mère de vitamine B12

Q.S.P. 1000 ml par l'eau bidistillée

Le pH est ajusté à 7,6

Le milieu est stérilisé par filtration sur filtre stérile Millipore 0,2 µm

Solution mère des microéléments composée de :

ZnCl ₂	4 mg/100 ml
H ₃ BO ₃	60 mg/100 ml
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,5 mg/100 ml
CuCl ₂ .2H ₂ O	4 mg/100 ml
MnCl ₂ .4H ₂ O	40 mg/100 ml
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	37 mg/100 ml

Solution mère de vitamine B12 : 1 mg vitamine B12 dans 100 ml d'eau.

Solution mère de fer : 240 mg FeCl₃.4H₂O dans une solution de Na₂EDTA 0,05 M.

ANNEXE 2

Milieu de culture eau de mer enrichie (Provasoli, 1968)

P.E.S. : 20 ml de solution mère dans 1 litre d' eau de mer stérile

solution mère : dans 1000 ml d' eau distillée :

- NaNO₃ 3,5 g
- Na₂ glycérophosphate 500 mg
- Fe EDTA..... 250 ml
- P II métaux..... 250 ml
- TRIS (tampon)..... 5 g
- Thiamine..... 5 mg
- Vitamine B12 100 µg
- Biotine 50 µg
- Eau distillée jusqu' à 1000 ml

Fe EDTA :

- Fe(NH₄)₂(SO₄)₂,6H₂O..... 351 mg
- Na₂ EDTA 300 mg
- Eau distillée qsp 500 ml

P II métaux :

- H₃BO₃ 570 mg
- FeCl₃,6H₂O 24,5 mg
- MnSO₄,4H₂O 82 mg
- ZnSO₄,7H₂O 11 mg
- CoSO₄,7H₂O..... 2,4 mg
- Na₂ EDTA 1000 mg
- Eau distillée qsp 500 ml

-->Ajuster le pH à 7,8

-->Mettre 2 ml de la solution PES dans 100 ml d' eau de mer filtrée (0,2 µm)

ANNEXE 3

Précipitation au C.T.A.B

- Prendre 20 ml et y ajouter 20 ml de C.T.A.B à 6% porté préalablement à 40°C et maintenir le mélange à 40°C au bain marie pendant 30 min.
- Placer le mélange à 4°C pendant une nuit.
- Réchauffer au bain marie à 40°C puis centrifuger à 2000g pendant une heure.
- Redissoudre le culot dans 5 ml de NaCl 0,2 M puis reprécipiter les polymères par 30ml d'éthanol absolu.
- Laisser une nuit à 4°C.
- Centrifuger à 2000g pendant 1 heure.

ANNEXE 4

Dosage des sucres totaux selon la méthode de Dubois (1956)

Réactifs

Solution de phénol à 5 %
Acide sulfurique concentré

Protocole

100 μl de la solution à doser contenant de 2,5 à 20 μg d'oses sont mélangés à 100 μl de la solution de phénol à 5 % (v/v). Le mélange est agité puis placé dans un bain de glace pour limiter l'élévation de température lors de l'ajout de 500 μl d'acide sulfurique concentré qui sont projetés brutalement à la surface du liquide. Le mélange est agité et placé 5 min au bain-marie à 100°C. Les tubes sont refroidis puis placés à l'obscurité 30 min pour stabiliser la coloration. La coloration orangée est estimée par colorimétrie à 492 nm. Des témoins de galactose ou de glucose sont principalement utilisés de 25 à 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Remarque

Le galactose a un coefficient de réponse de 100 % et le glucose de 138 %.

ANNEXE 5

Dosage des acides uroniques au méta-hydroxydiphényl selon la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973)

Réactifs

La solution de m-HDP est faite à 0,15 % (m/v) avec de la soude 0,5 % (m :v) dans de l'eau désionisée. La solution est conservée à 0 - +4°C à l'obscurité et renouvelée toutes les deux ou trois semaines, selon la fréquence d'utilisation.

La solution de tétraborate de sodium à 0,125 M est préparée avec de l'acide sulfurique concentré.

Protocole

Des solutions de D-galactose de 400 µg/ml, 200 µg/ml et 100 µg/ml, et d'acide D-galacturonique de 100 µg/ml, 50 µg/ml et 25 µg/ml sont respectivement préparées pour servir de témoins d'étalonnage. Dans des tubes à essai contenant 0,2 ml de solution à doser, maintenus à 0 - +4°C, sont ajoutés 1,2 ml de tétraborate de sodium. Après refroidissement des tubes, ceux-ci sont agités au vortex avant d'être placés au bain-marie à 100°C pendant 5 mn, à l'obscurité. Ensuite, les tubes sont mis à 0 - +4°C avant d'y ajouter 20 µl de m-HDP. Ils sont vigoureusement agités au vortex jusqu'au développement de la coloration. Enfin, la lecture est effectuée à 520 nm après 5-10 mn de repos.

Remarques

Les chromophores sont également rose-violacés pour les acides uroniques et certains oses neutres, comme le galactose à forte concentration alors que les oses donnent principalement une coloration brune. Les interférences des oses neutres sont négligeables par rapport aux acides uroniques comme l'acide galacturonique. Il faudrait, en effet, une concentration 40 fois supérieure à celle de l'acide galacturonique pour provoquer des erreurs de 2 à 5 %.

ANNEXE 6

Préparation des acétates d'alditols selon la méthode de Slonecker (1972)

Hydrolyse

Les polysaccharides (1 mg) sont hydrolysés à l'HCl 2N pendant 2 h à 100 °C dans des tubes fermés hermétiquement. L'acide est éliminé par 3 coévaporations à l'eau ultrapure à 30°C dans un évaporateur rotatif. Le résidu sec final est repris par 1 ml d'eau contenant du méso-inositol qui servira d'étalon interne. En général, la quantité de méso-inositol ajoutée correspond à 25 % de la quantité de polysaccharides hydrolysée.

Réduction

Une goutte de soude 0,5 N est ajoutée pour alcaliniser la solution. La réduction est réalisée par le NaBH₄ pendant 12 h à température ambiante sans fermer le tube car la réaction provoque un dégagement d'hydrogène. La réaction est arrêtée par acidification du milieu en ajoutant une résine Dowex 50 x 8 sous forme H⁺ Lorsque le pH = 6, l'échantillon est filtré sur laine de verre pour enlever la résine et évaporé à sec dans un évaporateur rotatif. L'excès de NaBH₄ est éliminé par une évaporation dans un mélange méthanol/acide acétique (99/1) et 3 coévaporations avec du méthanol. La dernière évaporation du méthanol est réalisée sous air comprimé pour obtenir un échantillon anhydre.

Acétylation

Elle est provoquée par l'anhydride acétique avec la pyridine comme catalyseur de la réaction dans des proportions 3/1 respectivement. L'acétylation est réalisée à 100°C pendant 45 min avec des tubes hermétiquement clos. Le produit réactionnel est évaporé à l'air comprimé puis repris par du CH₂Cl₂ et une goutte d'anhydride acétique pour conserver l'échantillon.

Remarque

Cette technique d'hydrolyse a l'inconvénient d'entraîner la destruction du 3,6-anhydro- α -L-galactose qui est un composant essentiel de l'agar.

Séparation et quantification des acétates d'alditols par CLG

Les monosaccharides transformés en acétates d'alditols sont séparés sur un chromatographe GC 14-A (Shimadzu) muni d'une colonne capillaire OV-1701 (25 m/0,32 mm/0,1 μ m). Le gaz vecteur est l'hélium utilisé à 1 kg.cm⁻². La température est programmée pour augmenter de 70 à 170°C à raison de 10°C/mn puis de 170°C à 210°C à raison de 2°C.mn⁻¹. La détection se fait par ionisation de flamme (FID) avec l'air (0,5 kg.cm⁻²) et l'hydrogène (0,6 kg.cm⁻²). L'identification des sucres est basée sur leur temps de rétention par comparaison à des témoins. La quantification est obtenue par intégration des pics et comparaison des aires par rapport au méso-inositol, en appliquant un coefficient de correction calculé à partir des témoins.

Remarque

Le 3,6-anhydro- α -L-galactose, n'existant pas dans le commerce, son temps de rétention est identifié après hydrolyse d'un agarose (Sea Kem, Serva) et transformation en acétates d'alditols.

ANNEXE 7

Préparation des acétates d'alditols selon la méthode de Stevenson et Furneaux (1991)

Hydrolyse et réduction

1 mg de polysaccharides est préhydrolysé avec 2,4 M d'ATFA pendant 5 min à 80°C en présence de 50 µl d'une solution à 80 mg.ml⁻¹ de MMB. 50 µl de la solution de MMB sont à nouveau ajoutés puis les échantillons placés dans des tubes fermés sont hydrolysés pendant 1 h à 120°C. Après l'hydrolyse, 100 µl de la solution de MMB sont finalement rajoutés en présence de 125 µg de méso-inositol utilisés comme étalon interne. La solution est évaporée à 50°C pendant 15 min à l'évaporateur rotatif. L'eau résiduelle est éliminée par azéotropie avec le CH₃CN par une seconde évaporation dans les mêmes conditions.

Acétylation

Elle est réalisée par l'Ac₂O avec 100 µl d'ATFA pur comme catalyseur réactionnel pendant 10 min à 50°C. L'acétylation est arrêtée par ajout d'1 ml de toluène suivi d'une évaporation à 50°C. Le résidu est repris dans 2,5 ml de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 2,5 ml d'H₂O. La phase aqueuse est éliminée et les traces d'H₂O sont piégées par ajout de Na₂CO₃ anhydre. L'échantillon est finalement passé sur filtre en PTFE de 0,5 µm de maille avant utilisation.

Remarque

L'utilisation de MMB qui réduit les oses en milieu acide, permet par une hydrolyse douce de préserver les 3,6-anhydro- α -L-galactose.

Séparation et quantification des acétates d'alditols par CLG

Les monosaccharides transformés en acétates d'alditols sont séparés sur un chromatographe GC 14-A (Shimadzu) muni d'une colonne capillaire OV-1701 (25 m/0,32 mm/0,1 µm). Le gaz vecteur est l'hélium utilisé à 1 kg.cm⁻². La température est programmée pour augmenter de 70 à 170°C à raison de 10°C/mn puis de 170°C à 210°C à raison de 2°C.mn⁻¹. La détection se fait par ionisation de flamme (FID) avec l'air (0,5 kg.cm⁻²) et l'hydrogène (0,6 kg.cm⁻²). L'identification des sucres est basée sur leur temps de rétention par comparaison à des témoins. La quantification est obtenue par intégration des pics et comparaison des aires par rapport au méso-inositol, en appliquant un coefficient de correction calculé à partir des témoins.

Remarque

Le 3,6-anhydro- α -L-galactose, n'existant pas dans le commerce, son temps de rétention est identifié après hydrolyse d'un agarose (Sea Kem, Serva) et transformation en acétates d'alditols.

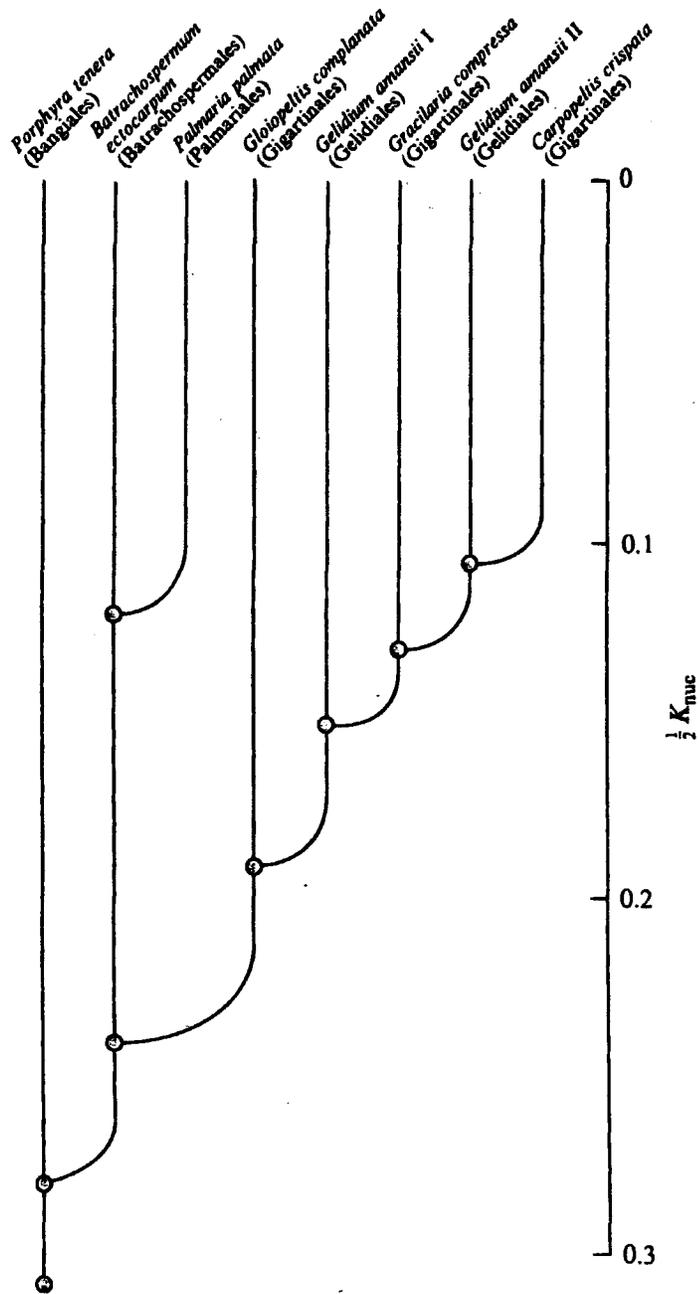
ANNEXE 8

Dosage de l'activité synthétase liée

Le mélange réactionnel est le suivant :

Tampon glycyglycine/NaOH (pH 9)	50 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM
ADP-Glc	1 mM
(U- ¹⁴ C) ADP-Glc (291 mCi/mmol)	2,7 μM
β-mercapto-éthanol	5 mM
MgCl ₂	5 mM
SAB (Serum Albumine Bovine)	50 mg/ml
Glycogène de foie de lapin	1 mg/ml
Citrate	0 ou 0,5 M

ANNEXE 9



Arbre phylogénétique des algues rouges, basé sur la sous-unité 5S du rRNA.
 $\frac{1}{2} K_{nuc}$ = distance d'évolution entre deux points de divergence des branches
 (d'après Van den Hoek et coll., 1995)

LISTE DES TRAVAUX

LISTE DES TRAVAUX

Rahaoui A., Feghali R., Moradi K., Bodineau L. and Lemoine Y. (1998)

Uptake of three toxic metal ions by exopolysaccharides from the red microalga *Rhodella violacea*. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 63/4b, pp 1707-1710

Mollet J.C., Rahaoui A. and Lemoine Y. (1998)

Yield, chemicals composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria* cf. *vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). *Journal of Applied Phycology*, 110 : 59-66

Rahaoui A., Colleoni C., Lemoine Y. et Ball S. (1998)

Polysaccharides de réserve chez *Rhodella violacea* algue rouge unicellulaire
Communication par affiche XVIIèmes Journées de la Chimie et de la Biochimie des Glucides, 1-5 juin 1998. Trégastel - France

Rahaoui A., Feghali R. and Kling R. (1996)

Isolation and regeneration of protoplasts and IR-TF spectroscopic investigation of *Porphyra umbilicalis* cell wall structure. *St European Phycological Congress*, Cologne, pp. 48

Rahaoui A., Feghali R. and Ellhaddaoui A. (1995)

Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhodella violacea* (Rhodophyta). *Spectroscopy of Biological Molecules*, edited by J.C. Merlin, S. Turrel and J.P. Huvenne, Kluwer Academic Publishers, pp 447-448

Rahaoui A., Kling R., Huvenne J.P. et Sombret B. (1995)

Utilisation de la microspectroscopie IRTF pour la caractérisation in situ des composés pariétaux du gamétophyte et du sporophyte de *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützling (Rhodophyta-Bangiophycideae). *Cryptogamie – Algologie*, 3 : 163-166

Rahaoui A. (1994).

Etude comparative des polysaccharides des gamétophyte et sporophyte chez le *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützling. (communication orale et par affiche) 3^{èmes} Journées Doctorales de Phycologie, Station Marine de Roscoff, organisées du 24 au 28 janvier 1994 par le Laboratoire des Biomembranes Végétales, E.N.S. de Paris

RESUME

Rhodella violacea (Kornmann) Wehrmeyer produit d'une part des exopolysaccharides dont une partie est dissoute dans le milieu de culture et l'autre partie, capsulaire, reste accolée aux cellules, d'autre part un polysaccharide de réserve, l'amidon floridéen. La carence en azote provoque chez cette algue une diminution de croissance, un verdissement des cellules, une augmentation de la production des polysaccharides de réserve et une diminution de la production des exopolysaccharides. La température optimale de culture au laboratoire est de 20°C. Pour s'adapter aux variations de température, cette algue modifie la composition de ses acides gras membranaires. L'adaptation aux températures supérieures à 20°C lui permet une certaine résistance au stress lumineux.

La composition monosaccharidique des exopolysaccharides solubles et capsulaires ne présente pas de différence significative. L'affinité croissante de ces polysaccharides aux ions métalliques, $Cr^{6+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Cr^{3+} > Ni^{2+}$ est déterminée par la spectroscopie IR-TF.

Nous avons montré, après l'extraction, la purification et le fractionnement de l'amidon floridéen, que celui-ci est constitué, comme d'autres amidons, d'amylose et d'amylopectine. L'étude structurale de ces deux composants a montré que le premier possède une structure linéaire et le second une structure branchée dont le taux de branchement est voisin de 3,6% et le degré de polymérisation moyen des branches varie de 2 à 55. La présence d'une protéine liée au grain d'amidon floridéen a été mise en évidence. L'analyse comparée des amidons floridéens de *Rhodella* et de 2 autres Rhodophycées révèle la grande variabilité de la teneur en amylose au sein des Rhodophyta.

ABSTRACT

Rhodella violacea (Kornmann) Wehrmeyer excretes exopolysaccharides part of which are dissolved in the culture medium and the remaining remains associated to the cells they surround. This alga also synthesizes floridean starch as a storage product. Nitrogen deficiency induces the decrease of growth, the greening of the cells, an increase of storage polysaccharide synthesis and a decrease of exopolysaccharide production. Optimal growth temperature in the laboratory is 20°C. This alga was shown to modify the fatty acid composition of membranes to adapt to temperature variations. Adaptation to temperatures over 20°C allows a better resistance to light stress.

Soluble and structural exopolysaccharide fractions do not exhibit significant differences in their monosaccharides composition. An increasing affinity of these polysaccharides for metal ions $Cr^{6+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Cr^{3+} > Ni^{2+}$ was determined by FT-IR spectroscopy.

We have shown, after extraction, purification and fractionation of floridean starch that it is composed, as starch, of amylose and of amylopectine. The structural analysis of both components has revealed that when the amylose has a linear structure, amylopectine has a branching pattern with a branching rate of 3.6 % and the mean d.p. of the chains varies from 2 to 55. A granule bound protein has been evidenced. The comparison of floridean starch compositions in *Rhodella* and 2 other red algae reveals the large variability of the amylose content among Rhodophyta.

